

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191827** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.08.31

(22) Дата подачи заявки
2012.06.29

(51) Int. Cl. *C12N 5/00* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(54) **КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

(31) **61/503,737**

(32) **2011.07.01**

(33) **US**

(62) **201391826; 2012.06.29**

(71) Заявитель:
АМГЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Фоллстад Брайан Д., Маккой
Ребекка Е., Моррис Арвия Е. (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Пармонова К.В. (RU)**

(57) Изобретение представляет способ культивирования клеток млекопитающих. Способ дает больший контроль над ростом клеток для получения большого значения титра клеточных культур.

202191827

A2

A2

202191827

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение представляет способ культивирования клеток млекопитающих. Способ дает больший контроль над ростом клеток для достижения
5 большего производства клеточных титров.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

С все большим увеличением количества терапевтических рекомбинантных белков, увеличением клеточного роста, жизнеспособности и образования белка, что может быть
10 достигнуто с помощью применения новых способов улучшения развития клеток, оптимизацией рабочей среды и параметров управления процессом. Сейчас большие усилия прилагаются к оптимизации процесса, в частности к способам и принципам культивирования, вскармливанию и ухода при производстве клеток.

Сейчас способы культивирования клеток, обеспечивающие относительные
15 улучшения в производстве рекомбинантных белков являются очень ценными, если учитывать в крупном масштабе расходы на культивирование клеток и растущую потребность в большем ее количестве и меньшей стоимости биологических продуктов.

Существует потребность в усовершенствовании процессов культивирования клеток, выделения рекомбинантных полипептидов, титров и жизнеспособности клетки, которые
20 могут привести к большему уровню производства, уменьшая таким образом расходы, связанные с производством белкового терапевтического средства. Настоящее изобретение удовлетворяет эти потребности, давая простой, легкий и недорогой способ регулирования роста клеток с увеличением производства белка.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение представляет способ ограничения роста клеток при культивировании клеток млекопитающих, выделяющих рекомбинантный белок, который
30 содержит образование клеток млекопитающих в бессывороточной среде для культивирования в биореакторе; способ вынужденного ограничения роста клеток с помощью перфузии в бессывороточной среде для культивирования с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее; способ ухода за клетками млекопитающих в условиях ограничения роста с помощью перфузии в бессывороточной среде с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее.

Настоящее изобретение также представляет способ увеличения производства
35 рекомбинантных белков при культивировании клеток млекопитающих, выделяющих рекомбинантный белок, который содержит образование клеток млекопитающих в бессывороточной среде для культивирования в биореакторе; способ вынужденного

ограничения роста клеток с помощью перфузии в бессывороточной среде для культивирования с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее; способ ухода за клетками млекопитающих в условиях ограничения роста с помощью перфузии в бессывороточной среде с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее. В связанных вариантах осуществления производство рекомбинантных белков при культивировании клеток млекопитающих увеличено по сравнению с культивированием, при котором клетки не обрабатываются L-аспарагином, вызывающим ограничение роста.

Настоящее изобретение также представляет способ ограничения культивирования клеток млекопитающих, которое содержит рекомбинантный белок с желаемым объемом уплотненных клеток, культивирующим клетки млекопитающих в бессывороточной среде для культивирования в биореакторе; способ вынужденного ограничения роста клеток с помощью перфузии в бессывороточной среде для культивирования с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее; способ ухода за клетками млекопитающих в условиях ограничения роста с помощью перфузии в бессывороточной среде с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в любом из вышеуказанных способов перфузия бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее начинается на третий день культивирования или после третьего дня. В другом варианте осуществления в любом из вышеуказанных способов введение ограничения роста клеток происходит до начала стадии производства. В другом варианте осуществления в любом из вышеуказанных способов введение ограничения роста клеток происходит во время стадии производства. В другом варианте осуществления в любом из вышеуказанных способов введение ограничения роста клеток вызвано недостатком L-аспарагина. В другом варианте осуществления в любом из указанных способов имеет место изменение температуры от 36°C до 31°C. В другом варианте осуществления в любом из указанных способов имеет место изменение температуры от 36°C до 33°C. В связанном варианте осуществления изменение температуры происходит при переходе от стадии роста к стадии производства. В другом варианте осуществления изменение температуры происходит во время стадии производства. В другом варианте осуществления способ содержит объем уплотненных клеток менее или равный 35% во время стадии производства. В связанном варианте осуществления объем уплотненных клеток во время стадии производства менее или равен 35%.

Настоящее изобретение также представляет способ культивирования клеток млекопитающих, содержащих рекомбинантный белок; культивирование в бессывороточной среде в биореакторе; рост клеток млекопитающих во время стадии роста и обеспечение среды культивирования с помощью шариковой подачи бессывороточной среды и уход за

клетками млекопитающих во время стадии производства с помощью перфузии бессывороточной среды, в которой объем уплотненных клеток во время стадии производства составляет 35% или менее. В одном варианте осуществления настоящего изобретения перфузия начинается от пятого до девятого дня культивирования клеток. В связанном варианте осуществления перфузия начинается от пятого до седьмого дня культивирования клеток. В другом варианте осуществления перфузия начинается, когда клетки достигают стадии производства. В другом варианте осуществления способ содержит ограничение роста клеток, вызванное с помощью недостатка L-аспарагина, следом за перфузией бессывороточной среды с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее. В другом варианте осуществления способ содержит ограничение роста клеток, вызванное перфузией бессывороточной обрабатывающей среды с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения содержание L-аспарагина в бессывороточной обрабатывающей среде составляет 5 миллимоль или менее. В другом варианте осуществления содержание L-аспарагина в бессывороточной обрабатывающей среде составляет 4,0 миллимоль или менее. В другом варианте осуществления содержание L-аспарагина в бессывороточной обрабатывающей среде составляет 3,0 миллимоль или менее. В другом варианте осуществления содержание L-аспарагина в бессывороточной обрабатывающей среде составляет 2,0 миллимоль или менее. В другом варианте осуществления содержание L-аспарагина в бессывороточной обрабатывающей среде составляет 1,0 миллимоль или менее. В другом варианте осуществления содержание L-аспарагина в бессывороточной обрабатывающей среде составляет 0 миллимоль. В другом варианте осуществления перфузия происходит со скоростью, которая растет во время стадии производства от 0,25 рабочего пространства до 1,0 рабочего пространства в день во время культивирования клеток. В связанном варианте осуществления перфузия происходит со скоростью, достигающей 1,0 рабочего пространства в день с девятого по одиннадцатый день культивирования клеток. В другом связанном варианте осуществления перфузия происходит со скоростью, достигающей 1,0 рабочего пространства в день на десятый день культивирования клеток. В другом варианте осуществления шариковая подача бессывороточной среды начинается на третий или четвертый день культивирования клеток. В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ содержит изменение температуры от 36°C до 31°C. В другом варианте осуществления способ содержит изменение температуры от 36°C до 33°C. В связанном варианте осуществления изменение температуры происходит при переходе от стадии роста к стадии производства. В связанном варианте осуществления изменение температуры происходит во время стадии производства.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения содержание L-аспарагина при культивировании клеточной среды регулируется до недостатка и во время недостатка L-аспарагина.

5 В одном варианте осуществления настоящего изобретения объем уплотненных клеток составляет 35% или менее. В связанном варианте осуществления объемом уплотненных клеток составляет 30% или менее.

10 В одном варианте осуществления настоящего изобретения плотность жизнеспособных клеток в клеточной культуре млекопитающих с объемом уплотненных клеток, равным или меньшим 35%, составляет от 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В связанном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток в клеточной культуре млекопитающих составляет от 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения перфузия является непрерывной перфузией.

15 В одном варианте осуществления настоящего изобретения скорость перфузии является постоянной.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения перфузия происходит со скоростью, меньшей или равной 1,0 рабочего пространства в день.

20 В другом варианте осуществления настоящего изобретения клеточная культура млекопитающих устанавливается с помощью введения в биореактор, как минимум, от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ клеток/миллилитр бессывороточной среды. В связанном варианте осуществления клеточная культура млекопитающих устанавливается с помощью введения в биореактор, как минимум, $0,5 \times 10^6$ до $1,5 \times 10^6$ клеток/миллилитр бессывороточной среды.

25 В другом варианте осуществления настоящего изобретения перфузия сопровождается изменяющимся тангенциальным потоком.

30 В другом варианте осуществления настоящего изобретения емкость биореактора составляет, как минимум, 500 л. В связанном варианте осуществления емкость биореактора составляет, как минимум, от 500 л до 2000 л. В другом связанном варианте осуществления емкость биореактора составляет, как минимум, от 1000 л до 2000 л.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения клетки млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (ЯКХ).

35 В другом варианте осуществления настоящего изобретения рекомбинантный белок выбирается из группы, содержащей человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, рекомбинантный составной белок или цитокин.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения любые из вышеуказанных способов содержат стадию сбора рекомбинантного белка, произведенного клеточной культурой.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения рекомбинантный белок, произведенный клеточной культурой, очищается и образуется в фармацевтически приемлимом составе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура: 1 начало процесса с подпитыванием: сплошной квадрат (■) и сплошной круг (●). Начало периодического процесса: незаполненный квадрат (□) и незаполненный круг (○).

Фигура 1A: плотность жизнеспособных клеток, Фигура 1B: жизнеспособность, Фигура 1C: титр.

Фигура 2: начало периодического процесса: незаполненный круг (○), начало процесса с подпиткой с сильным возбуждением: незаполненный квадрат (□).

Фигура 2A: плотность жизнеспособных клеток, Фигура 2B: жизнеспособность, Фигура 2C: титр, Фигура 2D: содержание аспарагина

Фигура 3: 1,0 начального объема перфузии, без изменения температуры: сплошной круг. 1,0 начального объема перфузии, без изменения температуры: незаполненный круг (○). 0,75 начального объема перфузии, без изменения температуры: сплошной квадрат (■). 0,75 начального объема перфузии, без изменения температуры: незаполненный квадрат (□).

Фигура 3A: плотность жизнеспособных клеток, Фигура 3B: жизнеспособность, Фигура 3C: титр.

Фигура 4: начало периодического процесса с низким содержанием аспарагина: незаполненный треугольник (Δ). Начало периодического процесса с регулируемым количеством L-аспарагина: сплошной треугольник (▲). Начало процесса с подпиткой с низким содержанием L-аспарагина: незаполненный ромб (◇). Начало процесса с подпиткой с регулируемым количеством L-аспарагина: сплошной квадрат (◆). Обработка с помощью трубы с отверстиями: сплошная линия. Обработка с помощью разбрызгивателей, полученных спеканием: пунктирная линия.

Фигура 4A: плотность жизнеспособных клеток, Фигура 4B: жизнеспособность, Фигура 4C: титр, учитывающий объем уплотненных клеток.

Фигура 5: культуры, выращенные в среде с содержанием 17,3 миллимоль или 5 миллимоль L-аспарагина и 4,6 миллимоль или 10 миллимоль L-глутамина. 17,3 миллимоль L-аспарагина и 4,6 миллимоль L-глутамина, сплошной ромб (◆) или 5 миллимоль L-аспарагина, 10 миллимоль L-глутамина, незаполненный ромб (◇).

Фигура 5A: плотность жизнеспособных клеток. Фигура 5B: титр. Фигура 5C: объем уплотненных клеток. Фигура 5D: титр, учитывающий объем уплотненных клеток. Фигура 5E: жизнеспособность.

5 Фигура 6: культивирование в 2 л стендовом и 500 л экспериментальном режиме, с 5 миллимолями L-аспарагина, 10 миллимолями L-глутамина. Среда содержит 5 миллимоль L-аспарагина, 10 миллимоль L-глутамина в 2 л стендовом режиме представлена сплошным ромбом (◆), 500 л экспериментальный режим представлен незаполненным ромбом (◇)

10 Фигура 6A: плотность жизнеспособных клеток. Фигура 6B: титр. Фигура 6C: объем уплотненных клеток. Фигура 6D: титр, учитывающий объем уплотненных клеток. Фигура 6E: жизнеспособность.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Во время производства рекомбинантных белков желательно иметь регулируемую систему, в которой клетки выращиваются до желаемой плотности, а затем физиологическое состояние клеток переключается на режим ограничения роста, состояние высокой производительности, в котором клетки используют энергию и субстраты для производства интересующего рекомбинантного белка вместо производства большего числа клеток. Способы достижения этой цели, такие как изменение температуры и возбуждение малых молекул, не всегда успешны и могут иметь нежелательное воздействие на качество продукта. Как описано здесь, объем уплотненных клеток может быть ограничен желаемым уровнем во время стадии производства с помощью вынужденного ограничения роста клеток в культивируемых клетках с низким содержанием L-аспарагина. Ограничение роста клеток может достигаться и поддерживаться с использованием обрабатывающей среды, содержащей ограниченную величину L-аспарагина и поддерживающей низкое содержание L-аспарагина в клеточной культуре (5 миллимоль или менее).

30 Также было установлено, что клетки с ограничением роста имеют большую производительность, если ограничение роста было вызвано низким содержанием или недостатком L-аспарагина, и клетки с ограничением роста последовательно обрабатывались клеточной культурой и обрабатывающей средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее.

35 Стадия производства с ограничением роста и большой производительностью может быть достигнута изменением концентрации L-аспарагина. Как описано здесь, истощение L-asparagine приводит к ограничению роста. В случае культивирования с подпитываемой средой, если плотность клеток достаточно высока (например, $\geq 20 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/миллилитр), клетки непрерывно испытывают недостаток L-аспарагина, несмотря на повторную подачу из-за потребления L-аспарагина и/или преобразования в L-аспарат. При

выращивании клеток внеклеточный L-аспарагин может быть преобразован в L-аспартат или аммиак. Истощение L-аспарагина приводит к ограничению цикла клеток. Во время подпитки, когда L-аспарагин присутствует в культуре, он приводит к повышенной производительности, промежутки времени, когда L-аспарагин исчерпан, приводят к 5 уменьшенной производительности. В обрабатывающей системе L-аспарагин подается непрерывно, что помогает избегать общего истощения, и может поддерживаться более высокий уровень содержания L-аспарагина, позволяя клеткам продолжить размножение без истощения или ограничения L-аспарагина. Контроль над содержанием L-аспарагина при достаточно низком содержании (например, содержание 5 миллимоль или менее) может 10 поддерживать высокую производительность клеток и устанавливать жизнеспособность и ограничение роста. В системе с шариковой и перфузионной подачей подаваемая среда может быть заменена из состава с высоким уровнем содержания (вызывающим рост) L-аспарагина при шариковой подаче и более низким уровнем содержания (ограничивающим рост) L-аспарагина при перфузионной подаче. Клеточные культуры с 15 ограничением роста с помощью ограничения L-аспарагина могут иметь высокую производительность добавлением низкого уровня содержания L-аспарагина.

В коммерческом масштабе для клеточной культуры и производства терапевтических средств способность ограничивать рост клеток и поддерживать клетки в этом состоянии во время стадии производства была бы крайне желательна. Присутствие 20 клеток, которые были введены для увеличения производительности во время ограничения роста и поддержания увеличенного производства, идеально для производственных целей.

Здесь описывается способ ограничения роста клеток в клеточной культуре млекопитающих, выделяющей рекомбинантный белок. Способ содержит ограничение роста клеток в клеточной культуре млекопитающих с помощью воздействия на клеточную 25 культуру бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее, с содержанием 0 миллимоль L-аспарагина. Такое введение может быть вызвано истощением L-аспарагина или созданием среды с низким уровнем содержания L-аспарагина с помощью перфузии культуры с бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее, или поддержанием среды с низким содержанием L-аспарагина. Клеточная 30 культура поддерживается в состоянии ограничения роста с помощью перфузии бессывороточной среды с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее, и поддерживается культура со средой с низким содержанием L-аспарагина.

Также представлен способ увеличения производства рекомбинантного белка в клеточной культуре млекопитающих, выделяющей рекомбинантный белок с помощью 35 введения низкого уровня аспарагина для ограничения роста клеток в клеточной культуре млекопитающих. Клетки млекопитающих поддерживаются в среде с низким уровнем

содержания аспарагина для ограничения роста проявляют большую производительность (г белок/клетка/день и г белок/масса клетки/день), чем те, рост которых не был ограничен низким содержанием аспарагина.

5 Такой способ также полезен для ограничения клеточной культуры млекопитающих с желаемым объемом уплотненных клеток. Объем уплотненных клеток во время стадии производства может быть ограничен до желаемого уровня с помощью уменьшения уровня L-аспарагина при производстве среды культивирования. Концентрация аспарагина 5 миллимоль или менее в обрабатываемой среде является достаточной для регулирования роста при культивировании и ограничивает желаемый объем уплотненных клеток.

10 Описанные здесь способы обеспечивают большой контроль над ростом клеток с высоким производством титров клеточных культур; и могут сами по себе упростить выделение газов по сравнению в перфузионными процессами с большой биомассой, а также минимизировать потери продукта при сборе и последующих процессах обработки.

15 Способ начинается с установления клеточной культуры млекопитающих в производственном биореакторе. Предпочтительно использование биореакторов меньшего размера, в одном варианте осуществления объем биореакторов составляет от 500 л до 2000 л. В предпочтительном варианте осуществления используются биореакторы объемом 1000 л – 2000 л. Плотность семенных камер, применяемая в биореакторе, может иметь положительное влияние на уровень произведенного рекомбинантного белка. В одном 20 варианте осуществления в биореактор вводится, как минимум, от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/миллилитр в бессывороточной среде. В предпочтительном варианте осуществления вводится $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/миллилитр.

Затем клетки млекопитающих проходят стадию экспоненциального роста. Клеточная культура может поддерживаться без дополнительной подачи, пока не 25 достигается желаемая плотность клеток. В одном варианте осуществления клеточная культура поддерживается без дополнительной подачи до трех дней, после чего следует перфузия бессывороточной среды с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее для введения и поддержания ограничения низкого содержания L-аспарагина. В другом варианте осуществления культура может быть введена с желаемой плотностью клеток для 30 начала стадии производства без кратковременной стадии роста с ограничением роста клеток, вызванным мгновенно после введения перфузией клеточной культуры с бессывороточной средой, содержащей 5 миллимоль или менее L-аспарагина для введения и поддержания ограничения низкого содержания L-аспарагина. В любом из описанных здесь вариантов осуществления переход от стадии роста к стадии производства может быть 35 вызван недостатком L-аспарагина (клетки подвергаются воздействию среды с содержанием 0 миллимоль L-аспарагина); после этого происходит перфузия клеточной среды с

содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или меньше, концентрация L-аспарагина в клеточной культуре поддерживается на этом уровне.

Независимо от того, насколько низко ограничивается рост при введении L-аспарагина, большая производительность наблюдается в клетках с ограниченным ростом в клетках, поддерживаемых перфузией среды с низким содержанием L-аспарагина и поддержанием клеточной культуры с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее.

Используемое здесь «ограничение роста», которое также может называться «ограничение роста клеток», является точкой, в которой число клеток перестает увеличиваться или когда клеточный цикл больше не продолжается. Ограничение роста может отслеживаться с помощью определения плотности жизнеспособных клеток клеточной культуры. Некоторые клетки в состоянии ограничения роста могут увеличиваться по размеру, но не по количеству, так что объем уплотненных клеток культуры с ограничением роста может увеличиваться. Ограничение роста может быть до некоторой степени обратным процессом, если здоровье клеток не ухудшается с введением в клеточную культуру L-аспарагина.

Ограничение роста вызвано L-аспарагином, когда плотность клеток культуры достигает уровня, когда концентрация L-аспарагина в культуре становится ограниченной при непрерывном росте или когда культура испытывает недостаток L-аспарагина. Недостаток L-аспарагина имеет место, когда содержание L-аспарагина в среде клеточной культуры составляет 0 миллимоль. Недостаток в течение 24 часов может привести к ограничению роста. Недостаток в течение большего времени, чем 48 часов, может нанести вред здоровью клеток. Для поддержания клеток в состоянии с ограниченным ростом содержание L-аспарагина в клеточной культуре должно поддерживаться на уровне 5 миллимоль или менее. Среда клеточной культуры с содержанием L-аспарагина, необходимым для ограничения роста клеток, зависит от способности клеток производить собственный аспарагин. Для культур, производящих собственный аспарагин, для ограничения роста может потребоваться более низкое содержание или даже выведение L-аспарагина из среды. Для культур, неспособных производить собственный аспарагин, например, клеток с недостатком активного фермента аспарагина синтетаза, для ограничения роста может использоваться содержание от 0 до 5 миллимоль L-аспарагина.

Используемый здесь «объем уплотненных клеток» (ОУК), называемый также «процентный объем уплотненных клеток» (%ОУК), является отношением объема, занимаемого клетками к общему объему клеточной культуры, выраженному в процентах (смотрите Settler, *et al.*, (2006) *Biotechnol Bioeng.* Dec 20:95(6):1228-33). Объем уплотненных клеток является функцией плотности клеток и диаметра клеток; рост объема уплотненных клеток могут быть вызваны ростом либо плотности клеток, либо диаметра

клеток, либо обоими. Объем уплотненных клеток является мерой содержания твердого вещества в клеточной культуре. Твердые вещества удаляются во время процессов сбора и последующей очистки. Большое количество твердых веществ означает большую энергию для отделения твердого вещества от желаемого продукта при стадиях сбора и последующей
5 очистке. Также необходимый продукт может остаться в твердых веществах и быть утерян во время процесса сбора, что приведет к меньшему сбору продукта. Поскольку сами клетки различны по размеру, а клеточные культуры также содержат мертвые и умирающие клетки и другие продукты распада клеток, объем уплотненных клеток является более точным способом для описания содержащихся твердых веществ в клеточной культуре, чем
10 плотность клеток или плотность жизнеспособных клеток. Например, 2000 л с плотностью клеток 50×10^6 клеток/мл может иметь очень различный объем уплотненных клеток в зависимости от размера клеток. Кроме того, некоторые клетки, находясь в состоянии ограничения роста, увеличиваются в размере, так что объем уплотненных клеток до и после ограничения роста, вероятно, будет различным из-за роста биомассы в результате
15 увеличения размера клеток.

При переходе от стадии роста к стадии производства и во время стадии производства процентный объем уплотненных клеток (%ОУК) составляет 35% или меньше. Желаемый объем уплотненных клеток, поддерживаемый во время стадии производства равен 35% или меньше. В предпочтительном варианте осуществления объем
20 уплотненных клеток равен 30% или меньше. В другом предпочтительном варианте осуществления объем уплотненных клеток равен 20% или меньше. В другом предпочтительном варианте осуществления объем уплотненных клеток равен 15% или меньше. В другом предпочтительном варианте осуществления объем уплотненных клеток равен 10% или меньше.

25 Используемая здесь «плотность клеток» означает число клеток в данном объеме культивируемой среды. «Плотность жизнеспособных клеток» означает число живых клеток в данном объеме культивируемой среды, как определено стандартными проверками жизнеспособности (такими как способ вытеснения трипановой сини).

Желаемая плотность жизнеспособных клеток при переходе от стадии роста к стадии
30 производства и во время стадии производства дает объем уплотненных клеток 35% или меньше. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл
35 до 70×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6

жизнеспособных клеток/мл до 60×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 50×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 40×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 30×10^6 жизнеспособных клеток/мл. В одном варианте осуществления плотность жизнеспособных клеток составляет, по меньшей мере, приблизительно от 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 25×10^6 жизнеспособных клеток/мл, предпочтительно около 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

Меньшая плотность уплотненных клеток во время стадии производства помогает устранить проблемы с растворенным кислородом, который может препятствовать более высокой плотности перфузионных культур. Меньшая плотность уплотненных клеток также позволяет средам меньшего объема использовать меньшие сосуды для хранения сред, а также такие клетки могут быть смешаны с более медленными расходами. Меньшая плотность уплотненных клеток также имеет меньшее влияние на процессы сбора и последующей обработки по сравнению с культурами с большей биомассой клеток. Все из них уменьшают стоимость, связанную с производством рекомбинантных белковых терапевтических средств.

Три способа, обычно используемые в коммерческих процессах производства рекомбинантных белков клеточной культурой млекопитающих: полунепрерывная культура, подпитываемая культура и перфузионная культура. Полунепрерывная культура, прерывистый способ, в котором клетки растут в фиксированном объеме культурной среды в течение короткого промежутка времени, после чего следует полный сбор. Культуры, выращенные с использованием полунепрерывного способа испытывают рост плотности клеток, пока не достигается максимальная плотность клеток, после чего плотность жизнеспособных клеток уменьшается, а компоненты среды потребляются, а уровни промежуточных продуктов метаболизма (таких как лактат и аммиак) накапливаются. Сбор обычно происходит в точке достижения максимальной плотности клеток (обычно $5-10 \times 10^6$ клеток/мл, в зависимости от состава среды, клеточной линии и т.д.). Полунепрерывная культура является простейшим способом, однако плотность

жизнеспособных культур ограничена наличием питательных веществ, а когда клетки имеют максимальную плотность, культура и производство уменьшается. Нет необходимости продлевать стадию производства, потому что накопление продуктов отходов и истощение питательных веществ быстро приводят к прекращению

5 культивирования (обычно от 3 до 7 дней).

Подпитываемая культура имеет преимущество над полунепрерывным процессом в том, что обеспечивает шариковую или непрерывную подачу среды для восполнения тех компонентов среды, которые были использованы. Поскольку подпитываемые культуры получают дополнительные питательные вещества во время работы, они могут достигать

10 больших плотностей клеток (>10 до 30×10^6 клеток/мл, в зависимости от состава среды, клеточной линии и т.д.) и больших титров продуктов по сравнению с полунепрерывным способом. В отличие от полунепрерывного процесса, двухфазная культура может создаваться и поддерживаться с помощью изменения способов подачи и составов среды для отличия срока пролиферации клеток для достижения желаемой плотности клеток

15 (стадия роста) от срока отложенного или медленного роста клеток (стадия производства). Сами по себе подпитываемые культуры не могут достигать больших титров продуктов по сравнению с полунепрерывными культурами. Обычно подпитываемые культуры используются во время стадии роста, подпитываемый способ используется во время стадии производства, но способ подачи с подпиткой может быть использован во время всего

20 процесса. Однако, в отличие от полунепрерывного процесса, объем биореактора является ограничивающим фактором по отношению к объему подачи. Так же, как в случае с полунепрерывным процессом, промежуточные продукты метаболизма накапливаются, что приведет к уменьшению культуры, что ограничивает длительность стадии производства приблизительно от 1,5 до 3 недель. Подпитываемые культуры являются непрерывными, и

25 сбор обычно происходит, когда промежуточные продукты метаболизма или жизнеспособность культуры достигают заранее определенных уровней.

Перфузионные способы имеют преимущество над полунепрерывным и подпитываемым процессом благодаря добавлению новой среды и одновременному удалению израсходованной среды. Типичные крупномасштабные способы коммерческого

30 культивирования клеток стремятся достигнуть высоких плотностей клеток, $60 - 90(+)\times 10^6$ клеток/мл, где от третьей части до более половины объема реактора является биомассой. В случае перфузионной культуры предельные плотности клеток $>1 \times 10^8$ клеток/мл были достигнуты, и предвидятся еще более высокие плотности. Типичные перфузионные культуры начинаются с полунепрерывной культуры, которая длится день или два, после

35 чего происходит непрерывная, пошаговая и/или прерывистая новая подача среды в культуру с одновременным удалением израсходованной среды во время стадий роста и

производства культуры с сохранением клеток и добавлением дополнительных весовых составляющих, таких как белки (на основе отсечения по молекулярной массе для фильтров). Различные способы, такие как отстаивание, центрифугирование или фильтрация могут использоваться для удаления израсходованной среды с сохранением плотности клеток. Докладывается о скорости перфузионного потока части рабочего объема в день до различных рабочих объемов в день. Преимуществом перфузионного процесса является то, что производственная культура может содержаться дольше, чем с полунепрерывным или подпитываемом способе. Однако, необходима большая подготовка, хранение, использование и удаление среды для поддержания долговременной перфузионной культуры, особенно с большой плотностью клеток, которые также требуют больше питательных веществ, и все это приводит к еще большему росту стоимости по сравнению с полунепрерывным или подпитываемым способом. Кроме того, большие плотности клеток могут вызвать проблемы во время производства, такие как поддержание уровней растворенного кислорода и проблемы с большим выделением газов, включая подачу дополнительного кислорода и удаление дополнительного диоксида углерода, что может привести к большему пенообразованию и необходимости внесения изменений в противопенные способы; точно так же во время сбора и последующих процессов обработки, когда требуется большая энергия для удаления избыточного клеточного материала, которая может привести к потере продукта, нивелирую преимущество большего титра из-за избыточной массы клеток.

Также, масштабный способ культивирования клеток, соединяющий подачу с подпиткой во время стадии роста, за которой следует непрерывная перфузия во время стадии производства. Способ нацелен на стадию производства, в которой клеточная культура поддерживается в объеме уплотненных клеток, меньшем или равном 35%. Способ также представляет начало и поддержание ограничения роста клеток при низком содержании аспарагина.

Подпитываемая культура является широко применяемым способ культивирования в крупных масштабах производства белков из клеток млекопитающих. *Смотреть, например, Chu and Robinson (2001), Current Opin. Biotechnol 12: 180-87.* Подпитываемая культура клеток млекопитающих является такой, что культура питается либо непрерывно, либо периодически с концентрированной подаваемой средой, содержащей питательные вещества. Подача может осуществляться по предопределенному графику, например, каждый день, один раз в два дня, один раз в три дня и т.д. По сравнению с полунепрерывной культурой, в которой подпитка не происходит, подпитываемая культура может производить большее количество рекомбинантных белков. *Смотрите, например, патент США № 5672502.*

В одном варианте осуществления используется подпитываемая культура с шариковой подачей для поддержания клеточной культуры во время стадии роста. Перфузионная подача может использоваться во время производственной стадии. В одном варианте осуществления перфузия начинается, когда клетки достигают стадии производства. В другом варианте осуществления перфузия начинается от 5 до 9 дня клеточной культуры. В другом варианте осуществления перфузия начинается от 5 до 7 дня клеточной культуры.

В другом варианте осуществления начало ограничения роста клеток в подпитываемой культуре может быть вызвано воздействием на подпитываемую культуру недостатком L-аспарагина, после чего происходит перфузия бессывороточной среды с содержанием L-аспарагин 5 миллимоль или менее. В одном варианте осуществления содержание L-аспарагина в клеточной культуре наблюдается до недостатка и во время недостатка L-аспарагина. В другом варианте осуществления начало ограничения роста клеток в подпитываемой культуре может достигаться перфузией бессывороточной среды с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее.

Использование шариковой подачи во время стадии роста позволяет клеткам переходить в стадию производства, что приводит к меньшей зависимости от изменения температуры, как средства, вызывающего и контролирующего стадию производства. Однако изменение температуры от 36°C до 31°C может происходить между стадиями роста и производства. В предпочтительном варианте осуществления изменение составляет от 36°C до 33°C.

В описанный здесь биореактор может быть введено, по меньшей мере, от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл в бессывороточной среде, предпочтительно $1,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл.

Перфузионная культура – это культура, в которой клеточная культура получает новую подачу обрабатываемой среды при одновременном удалении израсходованной среды. Перфузия может быть непрерывной, пошаговой, прерывистой или комбинацией любых из этих вариантов. Скорость перфузии может быть меньше, чем рабочий объем для многих рабочих объемов в день. Предпочтительно клетки сохраняются в культуре, и удаляемая израсходованная среда в основном не содержит клеток или не содержит значительно меньше клеток, чем культура. Рекомбинантные белки, выделенные клеточной культурой, могут также сохраняться в культуре. Перфузия может совершаться определенным числом средств, к которым относят центрифугирование, отстаивание или фильтрацию. *Смотрите, например, Voisard et al., (2003), Biotechnology and Bioengineering* 82:751-65. Предпочтительный способ фильтрации является фильтрацией переменного тангенциального потока. Переменный тангенциальный поток поддерживается с помощью

нагнетания среды через модули полуволоконного фильтра. *Смотрите, например, патент США №. 6544424; Furey (2002) Gen. Eng. News. 22 (7), 62-63.*

Используемая здесь «скорость перфузионного потока» означает объем среды (добавленный и удаленный), прошедший через биореактор и обычно выделяемый в виде части или единицы рабочего объема за определенное время. «Рабочий объем» означает объем биореактора, используемый для расположения клеточной культуры. В одном варианте осуществления скорость перфузионного потока составляет один рабочий объем в день или менее. Перфузионная подача среды может быть составлена для максимального увеличения питательных веществ для минимизации скорости перфузии.

«Клеточная культура» и «культура» означает рост и распространение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культивирования клеток млекопитающих являются известными в области техники. *Смотрите, например, Animal cell culture: A Practical Approach, D. Rickwood, ed., Oxford University Press, New York (1992).* Клетки млекопитающих могут быть культивированы в подвешенном состоянии, или в приложении к твердому субстрату. Могут быть использованы биореакторы с псевдооживленным слоем, полуволоконные биореакторы, роллерные флаконы, встряхиваемые колбы или биореакторы с механическим перемешиванием, с микроносителями или без микроносителей. В одном варианте осуществления используются биореакторы от 500 л до 2000 л. В предпочтительном варианте осуществления используются биореакторы от 1000 л до 2000 л.

В целях настоящего изобретения среда клеточной культуры является средой, пригодной для роста клеток животных, таких как клетки млекопитающих, в клеточной культуре *вне организма*. Составы среды клеточной культуры хорошо известны в области техники. Обычно среда клеточной культуры содержит буферные смеси, соли, углеводы, аминокислоты, витамины и важнейшие примеси. «Бессывороточная» среда означает среду клеточной культуры, не содержащей сыворотки животных, такой как эмбриональная бычья сыворотка. Различные тканевые культуры, включая среды определенных культур, доступны на рынке, например, любой один или комбинация следующих сред клеточных культур: среда RPMI-1640, среда RPMI-1641, минимальная эссенциальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко (DMEM), минимальная эссенциальная среда Игла, среда F-12K, среда Хэма F12, среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков, среда Маккоя 5А, среда Лейбовица L-15 и бессывороточная среда, такая как, EX-CELL™ Серия 300 (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas) среди прочих. Также доступны бессывороточные варианты таких культурных сред. Среда клеточной культуры может сопровождаться дополнительным или повышенным содержанием компонентов, таких как аминокислоты, соли, буферные смеси, сахара, витамины, гормоны, факторы роста,

антибиотики, липиды, примеси и так далее, в зависимости от требований к культивируемым клеткам и/или желаемым параметрам клеточной культуры.

Клеточные культуры могут иметь подачу концентрированной среды, содержащей компоненты, такие как питательные вещества и аминокислоты, потребляемые во время 5 стадии производства клеточной культуры. Подача концентрированной среды может основываться на практически любом составе среды клеточной культуры. Такая подача концентрированной среды может содержать большинство компонентов среды клеточной культуры, с 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X, 12X, 14X, 16X, 20X, 30X, 50X, 100x, 200X, 400X, 600X, 800X или даже 1000X номинальной величины. Подача концентрированной среды 10 часто используется в процессах подпитываемых культур.

Способ согласно настоящему изобретению может использоваться для увеличения производства рекомбинантных белков на различных стадиях процессов культивирования. В процессе с большим числом стадий клетки культивируются в двух или большем числе 15 отдельных стадий. Например, клетки могут культивироваться сначала в одной или нескольких стадиях роста в условиях среды, которые максимально увеличивают пролиферацию и жизнеспособность клеток, а затем могут передаваться в стадию производства при условии максимального производства белков. В коммерческом процессе производства белка клетками млекопитающих существует различное число стадий роста, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, которые происходят в различных сосудах для 20 культивирования до окончательного производства культуры. Стадии роста и производства могут следовать, или быть отделены, одним или несколькими переходными стадиями. В процессах с несколькими фазами способ согласно настоящему изобретению может использоваться, как минимум, во время стадий роста и производства на стадии окончательного производства коммерческой клеточной культуры, несмотря на то, что он 25 может также использоваться в предыдущей стадии роста. Стадия производства может проводиться в крупном масштабе. Крупномасштабный процесс может проходить в числе, как минимум, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 8000, 10,000, 15,000, 20,000 литров. В предпочтительном варианте осуществления производства происходит в биореакторах объемом 500 л, 1000 л и/или 2000 л. Стадия роста может происходить при более высокой 30 температуре, чем стадия производства. Например, стадия роста может происходить при первой температуре от 35°C до 38°C, а стадия производства может происходить при второй температуре от 29°C до 37°C, в некоторых вариантах – от 30°C до 36°C или от 30°C до 34°C. Кроме того, химические стимуляторы производства белков, например, такие как бутират, кофеин и гексаметилен-биацетамид (ГМБА), могут добавляться одновременно, до 35 и/или после изменения температуры. Если стимуляторы добавляются после изменения температуры, они могут добавляться от одного часа до пяти дней после изменения

температуры, в различных вариантах от одного до двух дней после изменения температуры. Клеточные культуры могут поддерживаться в течение дней или даже недель, пока клетки производят желаемый белок (белки).

5 Образцы клеточной культуры могут отслеживаться и оцениваться с помощью любого из аналитических способов, известных в области техники. Различные параметры, в том числе качество рекомбинантного белка, качество среды и характеристики могут отслеживаться во время культивирования. Образцы могут быть взяты и отслеживаться кратковременно на желаемой частоте, включая непрерывный мониторинг в режиме реального времени или близком к нему режиме. В одном варианте осуществления
10 содержание L-аспарагина в среде клеточной культуры отслеживается до недостатка и во время недостатка L-аспарагина.

Обычно клеточные культуры, которые предшествуют конечному производству культуры (N-x до N-1) используются для образования семенных камер, которые будут использованы для введения культуры N-1 для производства в биореакторе. Плотность
15 семенных камер может иметь положительное влияние на уровень производства рекомбинантных белков. Уровень производства растет с ростом плотности семян. Рост титра связан не только с большей плотностью семян, но и вполне может испытывать влияние со стороны клеточного цикла и метаболизма клеток, находящихся в производстве.

Семенные камеры могут производиться любым способом культивирования.
20 Предпочтительным способом является перфузионная культура с использованием фильтрации переменного тангенциального потока. Биореактор N-1 может работать с фильтрацией переменного тангенциального потока, представляющего клетки на высокой плотности для введения в биореактор для производства. Стадия N-1 может использоваться для роста клеток до плотностей $>90 \times 10^6$ клеток/мл. Биореактор N-1 может использоваться
25 для образования шариковых семенных культур или может использоваться, как культура подвижного семенного фонда, используемая для производства семян в биореакторах с высокой плотностью семенных камер. Длительность стадии роста производства может варьировать от 7 до 14 дней, и может быть организована для поддержания экспоненциального роста клеток до введения в биореактор для производства. Скорость
30 перфузии, состав среды и время оптимизированы для роста и доставки клеток в биореактор в наилучшем состоянии для оптимизации производства. Плотности семенных камер $>15 \times 10^6$ клеток/мл могут достигаться для производства семян в биореакторах. Большие плотности семенных камер при введении могут уменьшить или даже нивелировать время, необходимое для достижения желаемой плотности производства.

35 Настоящее изобретение находит частное применение в улучшении роста клеток, жизнеспособности и/или производстве белка с помощью процессов клеточных культур.

Клеточные линии (также называемые «клетка-хозяин»), используемые в этом изобретении являются генетически обработанными для выделения полипептидов, представляющих коммерческий или научный интерес. Клеточные линии обычно получают их линейки, получаемой из первичной культуры, и могут содержаться в культуре в течение неограниченного времени. Генетически измененная клеточная линия содержит трансфекцию, преобразование и превращение клеток с молекулами рекомбинантных полинуклеотидов и/или в обратном случае изменение (например, гомологической рекомбинацией и активацией генов или слияние рекомбинантной клетки с нерекомбинантной клеткой) для того, чтобы клетка-хозяин выделила желаемый рекомбинантный полипептид. Способы и направления генетически измененных клеток и/или клеточных линий, выделяющих интересующий полипептид, хорошо известны специалистам в области техники; например, различные способы проиллюстрированы в Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, и кварталные редакции); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R.J., Large Scale Mammalian Cell Culture, 1990, pp. 15-69.

Клеточные линии животных получены из клеток, предшественники которых были получены из многоклеточных животных. Один тип клеточной линии животных – это клеточная линия млекопитающих. Широкое разнообразие клеточных линий млекопитающих, пригодных для роста в культуре, доступны в American Type Culture Collection (Manassas, Va.) и у коммерческих производителей. Примеры клеточных линий, обычно используемых в промышленности включают VERO, ВНК, HeLa, CV1 (в том числе Cos), MDCK, 293, 3T3, миеломные клеточные линии (например, NSO, NS1), PC12, WI38 клетки и клетки яичника китайского хомячка (ЯКХ). Клетки ЯКХ широко используются для производства сложных рекомбинантных белков, например, в цитокинах, факторах свертывания крови и антителах, (Brasel *et al.* (1996), Blood 88:2004-2012; Kaufman *et al.* (1988), J. Biol Chem 263:6352-6362; McKinnon *et al.* (1991), J Mol Endocrinol 6:231-239; Wood *et al.* (1990), J. Immunol. 145:3011-3016). дигидрофолатредуктаза (ДФР) – недостающие мутантные клеточные линии (Urlaub *et al.* (1980), Proc Natl Acad Sci USA 77: 4216-4220), DXB11 и DG-44 являются желаемыми клетками-хозяевами ЯКХ, потому что эффективный ДФР выбираемой и усиливаемой системы выражения генов позволяет в этих клетках выделять высокий уровень рекомбинантных белков (Kaufman R.J. (1990), Meth Enzymol 185:537-566). Кроме того, этими клетками легко управлять в случае адгезивных или суспензионных культур, и проявляют относительно высокую генетическую устойчивость. Клетки ЯКХ и выделенные ими рекомбинантные белки были

охарактеризованы и утверждены к использованию в клиническом коммерческом производстве регулирующими органами.

Способы настоящего изобретения могут использоваться для клеточных культур, которые выделяют интересующие рекомбинантные белки. Выделенные рекомбинантные белки могут секретироваться в среду культуры, из которой они могут быть извлечены и/или собраны. Кроме того, белки могут быть очищены, или частично очищены, от таких культур или компонентов (*например*, от культурной среды) с помощью известных процессов и продуктов, доступных у коммерческих производителей. Очищенные белки затем могут «образованы», что означает, что буферный раствор сменяется, стерилизуется, помещается в многодозовую упаковку и/или упаковывается для конечного потребителя. Подходящие составы для фармацевтического состава содержат составы, описанные в книге *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18 ed., 1995, Mack Publishing Company, Easton, PA.

Используемые здесь понятия «пептиды», «полипептиды» и «белки» являются взаимозаменяемыми и относятся к молекуле, содержащей две или более аминокислотных остатков, присоединенных к каждой пептидными связями. Пептиды, полипептиды и белки также содержат, но не ограничиваются, модификациями, в том числе, гликозилирование белка, прикрепление липида, сульфатизация, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, гидроксиглирование и АДФ-рибозилирование. Полипептиды могут представлять научный или коммерческий интерес, в том числе лекарства на белковой основе. Полипептиды среди прочего содержат антитела, белки слияния и цитокины. Пептиды, полипептиды и белки производятся рекомбинантными клеточными линиями животных с использованием способов клеточной культуры и могут называться «рекомбинантными пептидами», «рекомбинантными полипептидами» и «рекомбинантными белками». Выделенный белок может быть произведен внутри клетки или секретироваться в культурную среду, из которой он может быть восстановлен и/или собран.

Примерами полипептидов, которые могут быть произведены способами настоящего изобретения, являются белки, содержащие секвенирование аминокислот, идентичных или очень похожих на все или часть одного из следующих белков: фактор некроза опухолей (ФНО), лиганд flt3 (WO 94/28391), эритропоэтин, тромбопоэтин, кальцитонин, IL-2, ангиопоэтин-2 (Maisonpierre et al. (1997), *Science*277(5322): 55-60), лиганд для рецептора активатора фактора транскрипции каппа Б (ЛРАЯФ (лиганд рецептора-активатора ядерного фактора), WO 01/36637), вызывающий апоптоз лиганд, связанный с фактором некроза опухолей (ФНО) (ФНО-апоптоз индуцирующий лиганд, WO 97/01633), лимфопоэтин, полученный из тимической стромы, thymic stroma-derived lymphopoietin, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ, патент Австралии № 588819), фактор роста

тучных клеток, фактор роста стволовых клеток (патент США № 6204363), эпидермальный фактор роста, кератиноцитарный фактор роста, фактор роста и развития мегакариоцитов, цитокин, белок человеческий фибриноген-подобный-2 (ФГП-2; НЦБИ № номер доступа NM_00682; Rüegg and Pytela (1995), Gene 160:257-62) гормон роста, инсулин, 5 инсулинотропин, инсулиноподобные факторы роста, гормон парашитовидной железы, интерфероны, в том числе α -интерферон, γ -интерферон и общие интерфероны (Патенты США № 4695623 и 4897471), нейроростовой фактор, синаптотагминоподобные белки (СПБ 1-5), нефротрофин-3, глюкагон, интерлейкины, колониестимулирующие фактор, β лимфотоксин, фактор, ингибирующий лейкемию и онкостатин-М. Описание белков, 10 которые могут быть произведены согласно способам изобретения, можно найти, например, в книгах Human Cytokines: Handbook for Basic and Clinical Research, все тома (Aggarwal and Gutterman, eds. Blackwell Sciences, Cambridge, MA, 1998); Growth Factors: A Practical Approach (McKay and Leigh, eds., Oxford University Press Inc., New York, 1993); и The Cytokine Handbook, Vols. 1 and 2 (Thompson and Lotze eds., Academic Press, San Diego, CA, 15 2003).

Кроме того, способы настоящего изобретения могут быть полезны для производства белков, содержащих все или часть секвенирования аминокислоты рецептора для любого из вышеуказанных белков, антагониста такого рецептора или любого из 20 вышеуказанных белков и/или белки, аналогичные по существу таким рецепторам или антагонистам. Эти рецепторы и антагонисты содержат: обе формы рецептора фактора некроза опухолей (РФНО, определенного на с. 55 и с. 75 патента США № 5395760 и патента США № 5610279), рецепторы интерлейкин-1 (ИЛ-1) (типы I и II; Европейский патент № 0460846, патент США 4968607 и патент США 5767064) антагонист рецептора ИЛ-1 (патент США № 6337072), антагонисты или ингибиторы ИЛ-1 (патенты США 25 № 5981713, 6096728 и 5075222), рецепторы ИЛ -2, рецепторы ИЛ-4 (Европейский патент № 0 367 566 и патент США № 5856296), рецепторы ИЛ-15, рецепторы ИЛ-17, рецепторы ИЛ-18, рецепторы Fc, гранулоцитарно-моноцитарный стимулирующий фактор рецептора, рецепторы для онкостатина-М и факторы ингибирования лейкемии, рецептор активатора фактора транскрипции Б (РАФТ, WO 01/36637 и патент США № 6271349), остеопротегерин 30 (патент США № 6015938), рецепторы для ФНО-апоптоз индуцирующего лиганда (в том числе рецепторы 1,2,3 и 4 для ФНО-апоптоз индуцирующего лиганда) и рецепторы, содержащие домены смерти, такие как апоптоз-индуцирующий рецептор (АИР).

Другие белки, которые могут быть произведены с помощью этого изобретения, содержат все или часть секвенирования аминокислот различных антигенов (называемых 35 CD белки) или их лигандов или белков, аналогичных по существу любому из них. Эти антигены описаны в Leukocyte Typing VI (Proceedings of the VIth International Workshop and

Conference, Kishimoto, Kikutani et al., eds., Kobe, Japan, 1996). Аналогичные CD белки описаны на соответствующих семинарах. Примеры таких антигенов содержат include CD22, CD27, CD30, CD39, CD40 и их лиганды (лиганд CD27, лиганд CD30 и т.д.). Некоторые из CD антигенов принадлежат к семейству рецепторов ФНО, которое также
5 содержит 41BB и OX40. Лиганды часто принадлежат к семейству ФНО, как лиганды 41BB и OX40.

Белки с активными ферментами и их лиганды также могут быть получены с помощью настоящего изобретения. Примеры содержат белки, содержащие часть или весь белок или его лиганд, или белок, аналогичный одному из следующих: члены области
10 семейства дезинтегина и металлопротеаза, в том числе альфа-ФНО преобразования фермента, различные киназы, глюкоцереброзидаза, супероксиддисмутаза, тканевой активатор пламиногена, фактор VIII, фактор IX, апилопротеин E, апилопротеин A-I, глобины, антогонист ИЛ-2, альфа-1 антитрипсин, лиганды любого из вышеуказанных ферментов и различные другие ферменты и их лиганды.

15 Термин «антитело» содержит ссылку и на гликированные, и на негликированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса, или ссылку на связывающую антигены область, дополняющую здоровое антитело для специального соединения, если не указано обратное, с человеческим, очеловеченным, химерным, полиспецифическим, моноклональным, поликлональным белком и олигомерами или антигенами, связывающими
20 их части. Также содержатся белки с частью, связывающей антигены, или такой как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, диатела, Fd, dAb, макситела, отдельные цепочки молекул антитела, фрагменты гипервариабельных участков (ГВУ), scFv, деатела, триатела, тетратела и полипептиды, содержащие, как минимум, часть иммуноглобулина, достаточную для придания специфическому антигену привязки к целевому полипептиду. Термин «антитело»
25 подразумевает, но не ограничивается, антителами, подготовленными, выделенными, созданными или изолированными рекомбинантными средствами, такими как антитела, изолированные от клетки-хозяина, трансфецированной для выделения антитела.

Примеры антител содержат, но не ограничиваются теми, которые распознают любой один или несколько белков, содержащих, но не ограничивающихся вышеуказанными белками
30 и/или следующими антигенами: CP2, CP3, CP4, CP8, CP11a, CP14, CP18, CP20, CP22, CP23, CP25, CP33, CP40, CP44, CP52, CP80 (B7.1), CP86 (B7.2), CP147, ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-7, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-8, ИЛ -10, ИЛ-2 рецепторами, рецептор ИЛ-4, рецептор ИЛ-6, рецептор ИЛ-13, подэлементы рецепторов ИЛ-18, FGL2, PDGF- β и их аналоги (*смотреть* патенты США № 5272064 и 5149792), рецепторы ФРЭС, ТФР, ТФР- β 2, ТФР - β 1, EGF (*смотреть* патент США № 6235883), рецептор ФРЭС, фактор роста гепатоцитов, лиганды остеопротегерина, интерферон-гамма, стимулятор В-лимфоцитов (СВ-Л, также известных как BAFF, THANK, TALL-1 и zТФР4; *смотреть* Do and Chen-Kiang (2002), *Cytokine Growth Factor Rev.* 13(1): 19-

25), C5 дополнение, IgE, опухолевый антиген CA125, опухолевый антиген MUC1, РЕМантиген, LCG (который является генным продуктом, выделенным вместе с раком легких), HER-2, HER-3, гликопротеин, связанный с опухолью, TAG-72, антиген SK-1, связанные с опухолью антигенные детерминанты, присутствующие в повышенных уровнях в сыворотке пациентов с раком толстой кишки и/или поджелудочной железы, связанные с раком антигенные детерминанты или протеины, выделенные из клеток с раком груди, толстой кишки, простаты, поджелудочной железы, легких, плоской клетки и/или почек, и/или клеток меланомы, глиомы, нейроblastомы, омертвевший центр опухоли, интегрин альфа 4 бета 7, интегрин VLA-4, интегрины B2, рецепторы 1, 2, 3 и 4 ФНО-апоптоза индуцирующего лиганда, РАФТ, РАФТ лиганд, ТФР- α , адгезивная молекула VAP-1, адгезивная молекула эпителиальных клеток (АМЭК), межмолекулярная адгезивная молекула-3 (МММ-3), адгезин лейкоинтегрин, гликопротеин тромбоцита гр. IIb/IIIa, тяжелая цепочка сердечного миозина, гормон парашитовидной железы, rNAPc2 (который является ингибитором фактора опухоли VIIa), МНС I, онкоэмбриональный антиген (ОЭА), альфа-фетопротеин (АФП), фактор некроза опухоли (ФНО), CTLA-4 (который является цитотоксичным связанным с Т-лимфоцитом антигеном), рецептор Fc- γ -1, HLA-DR 10 бета, HLA-DR антиген, склеротин, L-селестин, респираторно-синцитиальный вирус, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В (ВГ-В), *Streptococcus mutans* и *Staphylococcus aureus*. Специальные примеры известных антител могут быть произведены с помощью способов настоящего изобретения, содержащих, но не ограничивающихся адалимумабом, бевацизумабом, инфликсимабом, абсиксимабом, алемтузумабом, бапинеизумабом, базиликсимабом, белимумабом, бриакиумабом, канакинумабом, цертолизумаб пеголом, цетуксимабом, конатумумабом, деносумабом, гемтузумаб озогамацином, голимумабом, ибритумомаб тиуксетаном, лобетузумабом, матузумабом, матумумабом, меполизумабом, мотавизумабом, муромонабом-СР3, натализумабом, нимотузумабом, офатумумабом, омализумабом, ореговомабом, паливизумабом, панитумумабом, пемтумомабом, пертузумабом, ранибизумабом, ровелизумабом, тоцилизумабом, тоситумомабом, трастузумабом, устекинумабом, ведолизумабом, залутумумабом и занолимумабом.

Настоящее изобретение может также использоваться для производства рекомбинантных белков слияния, содержащих, например, любой из вышеуказанных белков. Например, рекомбинантные белки слияния содержат один из вышеуказанных белков плюс мультимеризационный домен, такой как лейциновая молния, двойная спираль, Fc часть иммуноглобулинового или аналогичного белка могут быть произведены с использованием способов настоящего изобретения. Например, см. публикацию международной заявки 94/10308; Lovejoy et al. (1993), *Science* 259:1288-1293; Harbury et al. (1993), *Science* 262:1401-05; Harbury et al. (1994), *Nature* 371:80-83; Håkansson et al. (1999), *Structure* 7:255-64. Среди таких рекомбинантных белков слияния содержатся белки, в

которых часть рецептора соединяется с Fc частью антитела, такого как этанерцепт (с. 75 TNFR:Fc) и белатацепт (CTLA4:Fc).

Поскольку терминология, используемая в этой заявке, является стандартной в области техники, определения некоторых терминов приведены здесь для внесения ясности и определенности в значение заявки. Единицы, приставки и символы могут обозначаться в системе СИ. Указанные здесь диапазоны чисел содержат числа, определяющие диапазон, а также содержат и поддерживают каждое целое число в указанном диапазоне. Описанные здесь способы и технологии обычно выполняются в соответствии с традиционными способами, хорошо известными в области техники, и как описано в различных общих и более специальных ссылках, которые приводятся и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иное. См., например, книгу Сэмбрука *с соавт.* Sabrook, *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) и Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992) и Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Все документы, или части документов, приведенные в этой заявке, указаны здесь посредством ссылки и содержат, но не ограничиваются, патентами, патентными заявками, книгами, учебниками. То, что описано в варианте осуществления изобретения может быть совмещено с другими вариантами осуществления настоящего изобретения.

Настоящее изобретения не должно ограничиваться областью действия специальных описанных здесь вариантов осуществления, которые приведены для иллюстрирования частных случаев изобретения; функциональные эквивалентные способы и компоненты применимы в пределах области действия настоящего изобретения. В действительности различные модификации настоящего изобретения кроме описанных здесь вариантов станут понятны специалистам в области техники из предыдущего описания и сопровождающих чертежей. Такие модификации должны попадать в область действия прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

30

Пример 1

Этот эксперимент сравнивает различные начальные условия способов полунепрерывной подачи и подпитываемой подачи перед перфузией с помощью фильтрации переменного тангенциального потока. Перфузия началась, либо рано во время стадии начального экспоненциального роста («полунепрерывное» начало) без дополнительных подач в перфузию, либо в конце экспоненциальной стадии, и попадает в

стационарную стадию, или в стадию производства («подпитываемое» начало) с получением шариковой подачи бессывороточной среды определенной подачи до перфузии.

В день 0, клетки ЯКХ, выделяющие рекомбинантное антитело, были введены в производственные биореакторы объемом 2 л в числе 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1500 мл бессывороточной определенной среды для подпитываемого начала и 1800 мл для полунепрерывного начала. Культуры находятся при температуре 36°C, растворенный кислород (РК) на уровне 30%, перемешивание при 215 оборотов в минуту. Глюкоза поддерживается на уровне выше 0 г/л и ниже 8 г/л.

Перфузия началась на четвертый день (0,25 объема/день) для полунепрерывных культур и на седьмой день (0,75 объема/день) для подпитываемых культур. Перфузия выполнена с помощью переменного тангенциального потока и системы фильтрации (Refine Technologies, Hanover, NJ, половолоконный фильтр 50 килодальтон). Перед началом перфузии подпитываемые культуры получают шариковую подачу концентрированной бессывороточной среды на четвертый день (7,5% начального рабочего объема) и день 6 (10% начального рабочего объема). Скорости перфузии приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Скорость перфузии

День	Скорость перфузии (объем/день)
0 – 4*	0,00
4 – 6	0,25
6 – 7	0,50
7 – 10	0,75
10 -	1,00

Значения основаны на описанных здесь рабочих объемах

*День 0-7 для подпитываемого начала

Во время роста культуры ежедневно брались образцы для оценки культуры. Плотность жизнеспособных клеток (ПЖК) и жизнеспособность определялись с помощью Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). Титр был измерен с помощью анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Объем уплотненных клеток определен с помощью VoluPAC (Sartorius, Goettingen, Germany).

Изменение температуры (от 36,0°C до 33,0°C) применялось, когда плотность жизнеспособных клеток превысила 20×10^6 жизнеспособных клеток/мл, что произошло на 7 и 11 день для полунепрерывного и подпитываемого начала соответственно.

Для полунепрерывного начала плотность жизнеспособных клеток продолжила расти после начала перфузии; для подпитываемого начала перфузия началась после того,

как клеточная культура достигла устойчивой или стационарной стадии с небольшим ростом. На 15 день плотность жизнеспособных клеток находилась между 27,7 и 30,7x10⁶ жизнеспособных клеток/мл, в то время как ПЖК полунепрерывной культуры находилась между 22,5 и 27,4x10⁶ жизнеспособных клеток/мл (Фигура 1А). Жизнеспособность 5 подпитываемой культуры находилась между 73,9 и 77,5%, в то время как жизнеспособность полунепрерывной культуры находилась между 72,5 и 83,1% (Фигура 1В). Титр подпитываемой культуры находился между 15,3 и 16,1 г/л, в то время как титр полунепрерывной культуры находился между 10,6 и 12,3 г/л (Фигура 1С). Поскольку значения интегрированной переменной плотности клеток (ИППК) аналогичны 10 всем четырем культурам на 15 день (приблизительно 230x10⁶ клеток/мл), то удельная производительность была больше в условиях подпитываемого начала. Подпитываемые культуры продолжены до 24 дня. За 20 дней был получен титр 20 г/л.

Переменный тангенциальный поток перфузии привел к росту производства с 15 подпитываемым началом с поддержанием клеток в более производительном состоянии по сравнению с полунепрерывным началом.

Пример 2

В день 0, клетки ЯКХ, выделяющие рекомбинантное антитело, были введены в производственные биореакторы объемом 2 л в числе 1x10⁶ жизнеспособных клеток/мл в 20 рабочем объеме 1500 мл бессывороточной определенной среды для подпитываемого начала и 1300 мл для полунепрерывного начала. Культуры находятся при температуре 36°C, РК на уровне 30%, перемешивание при 215 оборотов в минуту. Подпитываемая культура вращалась при 430 оборотах в минуту. В подпитываемую культуру подавалось 7 г/л глюкозы ежедневно до начала перфузии; у всех культур поддерживался уровень глюкозы 25 во время перфузии 4 г/л. Перфузия (переменный тангенциальный поток) началась на четвертый день (0,25 объема/день) для полунепрерывных культур и на восьмой день (0,75 объема/день) для подпитываемой культуры. До начала перфузии подпитываемая культура получает шариковую подачу концентрированной бессывороточной определенной среды на четвертый день (7,5% начального рабочего объема) и шестой день (10% 30 начального рабочего объема). Скорость перфузии приведена в Таблице 2. Культуры содержались в течение 21 дня.

Таблица 2. Скорость перфузии

День	Скорость перфузии (объем/день)
4 – 6	0,25

6 – 8	0,50
8 – 10	0,75
10 -	1,00

Значения основаны на описанных здесь рабочих объемах

Во время роста культуры ежедневно брались образцы для оценки культуры. Изменение температуры (от 36,0°C до 33,0°C) применялось с полунепрерывными культурами на шестой день, когда плотность жизнеспособных клеток превысила 20x10⁶ жизнеспособных клеток/мл, как в примере 1. Подпитываемая культура поддерживалась при температуре 36,0°C во время культивирования.

Для полунепрерывного начала плотность жизнеспособных клеток была аналогична описанному выше случаю, достигнув приблизительно от 20 до 25x10⁶ жизнеспособных клеток/мл, без роста после дня 10. Подпитываемая культура достигала почти 30x10⁶ жизнеспособных клеток/мл на 20 день после того, как прошла большая часть культуры с содержанием меньше 20x10⁶ жизнеспособных клеток/мл, смотрите Фигуру 2А. Жизнеспособность оставалась выше 80% до 10 дня, а затем упала приблизительно до 40% на 20 день после начала полунепрерывной культуры и 60% для подпитываемой культуры; смотрите Фигуру 2В. Наибольшее значение титра составило почти 15 г/л для полунепрерывных культур, смотрите Фигуру 2С. Было замечено, что начало полунепрерывной культуры с содержанием L-аспарагина около 3-4 миллимоль произошло на третий день и не испытало воздействия среды с ограничением аспарагина. Однако подпитываемое начало культуры с перфузией испытало недостаток L-аспарагина на 6 день до начала перфузии на 7 день. Затем имела место перфузия культуры средой с содержанием L-аспарагина 2,0 г/л (или 13,3 миллимоль), что не привело к дальнейшим ограничениям L-аспарагина после 8 дня (Фигура 2D). Концентрация глюкозы в основном поддерживалась между 4 и 10 г/л.

Подпитываемое начало с сильным вращением культуры дает максимальный титр (более 20 г/л) за 20 дней, более чем на 5 г/л больше, чем при полунепрерывном начале, которое было аналогично вышеописанным результатам. Отрицательные эффекты более быстрой скорости вращения не наблюдались. Поддерживание постоянной температуры не привело к негативному воздействию на подпитываемую культуру.

30 Пример 3

Этот эксперимент характеризует влияние объема перфузии и изменений температуры на переменный тангенциальный поток с подпитываемым началом, как описано выше. Все культуры с перфузией были начаты с подпитываемым началом на 7

день. Была проверена скорость перфузии от трех четвертей объема к полному объему или от полного рабочего объема к трем четвертям рабочего объема. Было проведено изменение температуры от 36°C до 33°C на 14 день.

В день 0, клетки ЯКХ, выделяющие рекомбинантное антитело, были введены в производственные биореакторы объемом 2 л в числе 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1200 мл бессывороточной определенной среды. Культуры находились при температуре 36°C, РК на уровне 30%. До начала перфузии подавалось 7 г/л глюкозы; у всех культур поддерживался уровень глюкозы во время перфузии 1 г/л. Культура поддерживалась 20 дней.

Культуры получили шариковую подачу концентрированной бессывороточной среды на четвертый день (7,5% начального рабочего объема) и шестой день (10% начального рабочего объема). Перфузия началась на 8 день. Скорости перфузии приведены в Таблице 3. Одна культура из каждой группы имела изменение температуры от 36°C до 33°C на 15 день, другие культуры оставались при 36°C во время эксперимента

15

Таблица 3. Скорость перфузии

Условие	День	Скорость перфузии (объем/день)
Условие 1 (n=2)	8 – 12	0,75
	12 -	1,00
Условие 2 (n=2)	8 – 10	1,00
	10 –	0,75

Значения основаны на описанных здесь рабочих объемах

Изменение температуры и скорость перфузии не повлияли на плотность жизнеспособных клеток, смотрите Фигуру 3А. Однако изменение температуры помогает дольше сохранить жизнеспособность клеток в культуре. Существует разрыв между условиями изменения температур начиная с 15 дня. Жизнеспособность культур с измененной температурой падает более медленно, чем культуры с температурой 36°C, смотрите Фигуру 3В. Что касается титра, три культуры проявляют очень похожие титры на 15 день (17,1-17,9 г/л), и на 20 день (22-24 г/л), но одна культура имела больший титр на 15 день (21,58 г/л) и на 20 день (28,33 г/л) (смотрите Фигуру 3С). Ни температура, ни скорость перфузии не повлияли на производство титра, что говорит о том, что культуры могут содержаться при различных скоростях перфузии.

25

Пример 4

Этот эксперимент исследует влияние перфузионной среды с концентрацией аспарагина и условия начала перфузии, либо с ограничением L-аспарагина, либо без ограничения среды культуры по плотности жизнеспособных клеток во время стадии производства.

В день 0 клетки ЯКХ, выделяющие рекомбинантное антитело, были введены в производственные биореакторы объемом 2 л в числе 1×10^6 жизнеспособных клеток/мл в рабочем объеме 1500 мл для полунепрерывного, и для подпитываемого способов. Культуры находились при температуре 36°C, РК на уровне 30%, скорость вращения 400 оборотов в минуту. Распространение происходило либо с помощью трубки с отверстиями, либо с помощью разбрызгивателей, полученных спеканием. Уровень глюкозы поддерживался выше 0 г/л и ниже 8 г/л.

Перфузия (переменный тангенциальный поток) началась на третий день (0,29 объема/день) для полунепрерывных культур «с неограниченным содержанием аспарагина» и на седьмой день (0,48 объема/день) для подпитываемой культуры «с ограниченным содержанием аспарагина». Полунепрерывная культурная среда содержала 10 миллимоль L-аспарагина. До начала перфузии подпитываемая культура получает шариковую подачу концентрированной бесывороточной определенной среды на третий день и шестой день (7% начального рабочего объема) с содержанием 113,4 миллимоль L-аспарагина. Содержание аспарагина в обрабатываемой среде имеет либо регулируемое содержание (17,3 миллимоль аспарагина в определенной бесывороточной обрабатываемой среде) или низкое содержание (5 миллимоль аспарагина в определенной бесывороточной обрабатываемой среде). Перфузия проводилась, как описано выше. Скорости перфузии приведены в Таблице 4.

25

Таблица 4. Скорость перфузии

Условие	День	Скорость перфузии (объем/день)
День 3	3 – 4	0,29
Начало перфузионной культуры с неограниченным содержанием аспарагина	4 - 7	0,48
	7 – 9	0,48
	9 – 11	0,67
	11 – 20	0,96
День 7 Начало	7 – 9	0,48
	9 – 11	0,67

подпитываемой культуры с ограниченным содержанием аспарагина	11 – 20	0,96
--	---------	------

Во время роста культуры ежедневно брались образцы для оценки культуры. Плотность жизнеспособных клеток (ПЖК) и жизнеспособность определялись с помощью Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). Титр был измерен с помощью анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Все культуры имели температуру 36,0°C.

Уменьшение роста клеток и рост производительности были достигнуты во время стадии производства с помощью ограничения аспарагина в культурной среде. На 15 день максимальная плотность жизнеспособных клеток составляла около $17,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл для подпитываемых культур с низким содержанием аспарагина (Фигуре 4А). Уровень содержания аспарагина в культуре достиг плотности жизнеспособных клеток более 40×10^6 жизнеспособных клеток/мл (>30% объема уплотненных клеток). Жизнеспособность подпитываемой культуры с низким содержанием контролируемого параметра составила 67,1%, а полунепрерывной культуры – 55,1%, содержание аспарагина контролируемого параметра составила 69% (Фигура 4В). Объем уплотненных клеток имел титр подпитываемой культуры с низким содержанием аспарагина на уровне 17,0 г/л (для объема уплотненных клеток), в то время как титр подпитываемой культуры был около 15,4 г/л (Фигура 4С). Титры культур составили от 10,2 до 12,9 г/л (полунепрерывное начало) и от 14,2 до 15,9 г/л (подпитываемое начало).

Поддерживание уровней содержания аспарагина 5 миллимоль или менее во время производства привело к ограничению роста, повысило производительность и поддерживало жизнеспособность во время стадии производства.

Пример 5

Этот эксперимент сравнивает условия среды во время перфузии. В этом эксперименте с биореактором объемом 2 л клетки вводились в химически определенную полунепрерывную среду с рабочим объемом 1,5 л, культивировались в течение 3 дней и затем разбрызгивались в течение 12 дней с помощью химически определенной обрабатывающей среды, содержащей либо 17,3 миллимоль L-аспарагина и 4,6 миллимоль L-глутамин, либо 5 миллимоль L-аспарагина и 10 миллимоль L-глутамин. Перфузия проводилась с помощью переменного тангенциального потока перфузии и системы фильтрации (Refine Technologies, Hanover, NJ) с половолоконным фильтром на 30 килодальтон (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Перфузия началась на третий день со скоростью 0,3 объемов культуры в день. Скорость перфузии возрастала на 4, 9 и 11 день, как указано в Таблице 6 ниже.

Культуры сохранялись при температуре 36°C, РК 30%, pH 7.0 и скорости вращения 400 оборотов в минуту.

Во время роста культуры ежедневно брались образцы для оценки культуры. Плотность жизнеспособных клеток (ПЖК) и жизнеспособность определялись с помощью Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA). Титр был измерен с помощью анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Объем уплотненных клеток определен с помощью VoluPAC (Sartorius, Goettingen, Germany).

Таблица 5. Скорость перфузии

День	Скорость перфузии (объем/день)
3	0,30
4	0,50
9	0,67
11	0,96

10

Ограничение аспарагина привело к накоплению меньшего числа клеток и росту производительности. Культуры, обрабатываемые средой с содержанием аспарагина 5 миллимоль достигли максимальной ПЖК в $8,16 \times 10^7 - 8,54 \times 10^7$ клеток/мл, в то время как культуры, обрабатываемые средой с содержанием 17,3 миллимоль аспарагина, достигали $11,9 \times 10^7 - 12,2 \times 10^7$ клеток/мл (Фигура 5А). Несмотря на то, что в 17,3 миллимолей аспарагина содержалось больше клеток, культуры в 5 миллимолях аспарагина производили больше продукта. Культуры, обрабатываемые средой с содержанием 17,3 миллимоль аспарагина, производили 6,89-7,18 г/л (4,33 – 4,67 г/л объем уплотненных клеток) по сравнению с 7,59-8,15 г/л (5,01 – 5,38 г/л объем уплотненных клеток) для культур, обрабатываемых средой с содержанием 5 миллимоль аспарагина (Фигуры 5В и 5D). Окончательный объем уплотненных клеток (ОУК) 5 миллимоль аспарагина содержал немного меньше, чем 17,3 миллимоль аспарагина (Фигура 5С), без разницы в жизнеспособности культуры (Фигура 5Е).

20

Интересно, что в этом примере рост концентрации глутамина больше, чем в два раза в условиях с низким содержанием аспарагина (4,6 миллимоль против 10 миллимоль глутамина) не связан со способностью среды с низким содержанием аспарагина ограничивать рост культуры.

25

Пример 6

30

Этот пример сравнивает показатели клеточной линии, выделенной из антитела клонированного ЯКХ в процессе с использованием ограничение аспарагина для контроля

роста в лабораторных и пилотных условиях. Лабораторная модель использовала биореакторы объемом 2 л, а пилотная модель – объемом 500 л. В лабораторной модели клетки вводились в химически определенную полунепрерывную среду объемом 1,5 л, а в пилотной модели объем биореактора составлял около 378 л. Клетки культивировались в течение 3 дней в полунепрерывной среде, а затем обрабатывались в течение 12 дней с помощью химически определенной обрабатывающей среды, содержащей 5 миллимоль L-аспарагина и 10 миллимоль L-глутамина. Перфузия проводилась с помощью перфузии переменного тангенциального потока и системы фильтрации (Refine Technologies, Hanover, NJ) с половолоконным фильтром на 30 килодальтон (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Перфузия началась на 3 день при скорости 0,3 объема культуры в день. Скорость перфузии увеличивалась на 4, 9 и 11 дни, как указано ниже в Таблице 7. Культуры содержались при температуре 36°C, 30% РК и pH 6.9.

Во время роста культуры ежедневно брались образцы для оценки культуры. Плотность жизнеспособных клеток (ПЖК) и жизнеспособность в лабораторных условиях определялись с помощью Vi-Cell (Beckman Coulter, Brea, CA), а в пилотных условиях с помощью CEDEX (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Титр был измерен с помощью анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Объем уплотненных клеток определен с помощью VoluPAC (Sartorius, Goettingen, Germany).

Таблица 6. График скорости перфузии

День	Скорость перфузии (объем/день)
3	0,30
4	0,50
9	0,67
11	0,96

Приведены данные из четырех лабораторных культур и двух пилотных культур. Кривые ПЖК подобны в обоих условиях, контроль роста достигнут (Фигура 6А) и общая масса клеток (объем уплотненных клеток) поддерживался ниже 30% в обеих культурах (Фигура 6С). Несмотря на то, что ПЖК достиг устойчивого положения около 10 или 11 дня, объем уплотненных клеток продолжил расти приблизительно до 13 или 14 дня (Фигура 6С). Производительность двух культур также была похожа. Культура, обрабатываемая средой с содержанием 5 миллимоль аспарагина, вырабатывала 14,2 – 15,7 г/л (10,7 – 11,4 г/л объема уплотненных клеток) в лабораторных условиях с реактором объемом 2 л по сравнению с 15,0 – 17,3 г/л (10.6 – 12.8 г/л объема уплотненных клеток) в пилотных условиях с объемом 500 л (Фигуры 6В и 6D). Жизнеспособность оказалась немного ниже в пилотных условиях (Фигура 6Е).

Формула изобретения

1. Способ ограничения роста клеток в клеточной культуре млекопитающих, выделяющей рекомбинантный белок, который отличается тем, что содержит:

установление клеточной культуры млекопитающих в бессывороточной культурной среде в биореакторе;

введение ограничения роста клеток с помощью обработки бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее;

поддерживание клеток млекопитающих в состоянии ограничения роста с помощью обработки бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее.

2. Способ увеличения производства рекомбинантного белка в клеточной культуре млекопитающих, выделяющей рекомбинантный белок, который отличается тем, что содержит:

установление клеточной культуры млекопитающих в бессывороточной культурной среде в биореакторе;

введение ограничения роста клеток с помощью обработки бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее;

поддерживание клеток млекопитающих в состоянии ограничения роста с помощью обработки бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее.

3. Способ ограничения клеточной культуры млекопитающих, выделяющей рекомбинантный белок с желаемым объемом уплотненных клеток, который отличается тем, что содержит

установление клеточной культуры млекопитающих в бессывороточной культурной среде в биореакторе;

введение ограничения роста клеток с помощью обработки бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее;

поддерживание клеток млекопитающих в состоянии ограничения роста с помощью обработки бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее.

4. Способ ограничения клеточной культуры млекопитающих, выделяющей рекомбинантный белок с предельной плотностью клеток $>1 \times 10^8$ клеток/мл или менее, который отличается тем, что содержит

установление клеточной культуры млекопитающих в бессывороточной культурной среде в биореакторе;

введение ограничения роста клеток с помощью недостатка L-аспарагина;

поддерживание клеток млекопитающих в состоянии ограничения роста с помощью обработки бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее.

5. Способ по любому из пп. 1-4, который отличается тем, что содержит обработку бессывороточной средой с содержанием L-аспарагина 5 миллимоль или менее на третий день культуры или ранее.

6. Способ по любому из пп. 1-4, который отличается тем, что содержит введение ограничения роста клеток до начала стадии производства.

7. Способ по любому из пп. 1-4, который отличается тем, что содержит введение ограничения роста клеток во время стадии производства.

8. Способ по любому из пп. 1-4, который отличается тем, что ограничение роста клеток вызвано недостатком L-аспарагина.

9. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно включающий изменение температуры, при котором температура понижается от 35°C - 38°C до 30°C - 34°C.

10. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно включающий изменение температуры, при котором температура снижается с 35°C - 38°C до 30°C - 34°C, при этом изменение температуры происходит при переходе между стадией роста и стадией производства, во время стадии производства или перед стадией производства.

11. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно включающий изменение температуры, при котором стадия роста происходит при температуре от около 35°C до около 38°C, а стадия производства происходит при температуре от около 30°C до около 34°C.

12. Способ по любому из пп. 1-4, который отличается тем, что содержит изменение температуры от 36°C до 31°C.

13. Способ по любому из пп. 1-4, который отличается тем, что содержит изменение температуры от 36°C до 33°C.

14. Способ по п. 9, который отличается тем, что изменение температуры происходит на переходе от стадии роста к стадии производства.
15. Способ по п. 9, который отличается тем, что изменение температуры происходит во время стадии производства.
16. Способ по любому из пп. 1-15, который отличается тем, что содержание L-аспарагина в бессывороточной среде составляет 5 миллимоль или менее.
17. Способ по любому из пп. 1-15, который отличается тем, что содержание L-аспарагина в бессывороточной среде составляет 4,0 миллимоль или менее.
18. Способ по любому из пп. 1-15, содержание L-аспарагина в бессывороточной среде составляет 3 миллимоль или менее.
19. Способ по любому из пп. 1-15, содержание L-аспарагина в бессывороточной среде составляет 2,0 миллимоль или менее.
20. Способ по любому из пп. 1-15, содержание L-аспарагина в бессывороточной среде составляет 1,0 миллимоль или менее.
21. Способ по любому из пп. 1-15, содержание L-аспарагина в бессывороточной среде составляет 0 миллимоль.
22. Способ по любому из пп. 1-21, который отличается тем, что содержание L-аспарагина в среде клеточной культуры отслеживается до начала и во время недостатка L-аспарагина.
23. Способ по любому из пп. 1-22, который отличается тем, что объем уплотненных клеток во время стадии производства равен 35% или менее.
24. Способ по п. 23, который отличается тем, что объем уплотненных клеток во время стадии производства равен 30% или менее.
25. Способ по п. 23, который отличается тем, что плотность жизнеспособных клеток культуры клеток млекопитающих в объеме уплотненных клеток составляет 35% или

менее и составляет от 10×10^6 жизнеспособных клеток/мл до 80×10^6 жизнеспособных клеток/мл.

26. Способ по любому из пп. 1-25, который отличается тем, что обработка содержит непрерывную обработку.

27. Способ по любому из пп. 1-26, который отличается тем, что скорость перфузии является постоянной.

28. Способ по любому из пп. 1-27, который отличается тем, что обработка проводится со скоростью, меньшей или равной 1,0 рабочих объемов в день.

29. Способ по любому из пп. 1-27, который отличается тем, что обработка проводится со скоростью, увеличивающейся во время стадии производства от 0,25 рабочего объема 1,0 рабочего объема в день во время культивирования клеток.

30. Способ по любому из пп. 1-29, который отличается тем, что клеточная культура млекопитающих устанавливается с помощью введения в реактор, как минимум, от $0,5 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^6$ клеток/мл в бессывороточной культурной среде.

31. Способ по любому из пп. 1-29, который отличается тем, что клеточная культура млекопитающих устанавливается с помощью введения в реактор, по меньшей мере, от $0,5 \times 10^6$ до $1,5 \times 10^6$ клеток/мл в бессывороточной культурной среде.

32. Способ по любому из пп. 1-31, который отличается тем, что обработка выполняется переменным тангенциальным потоком.

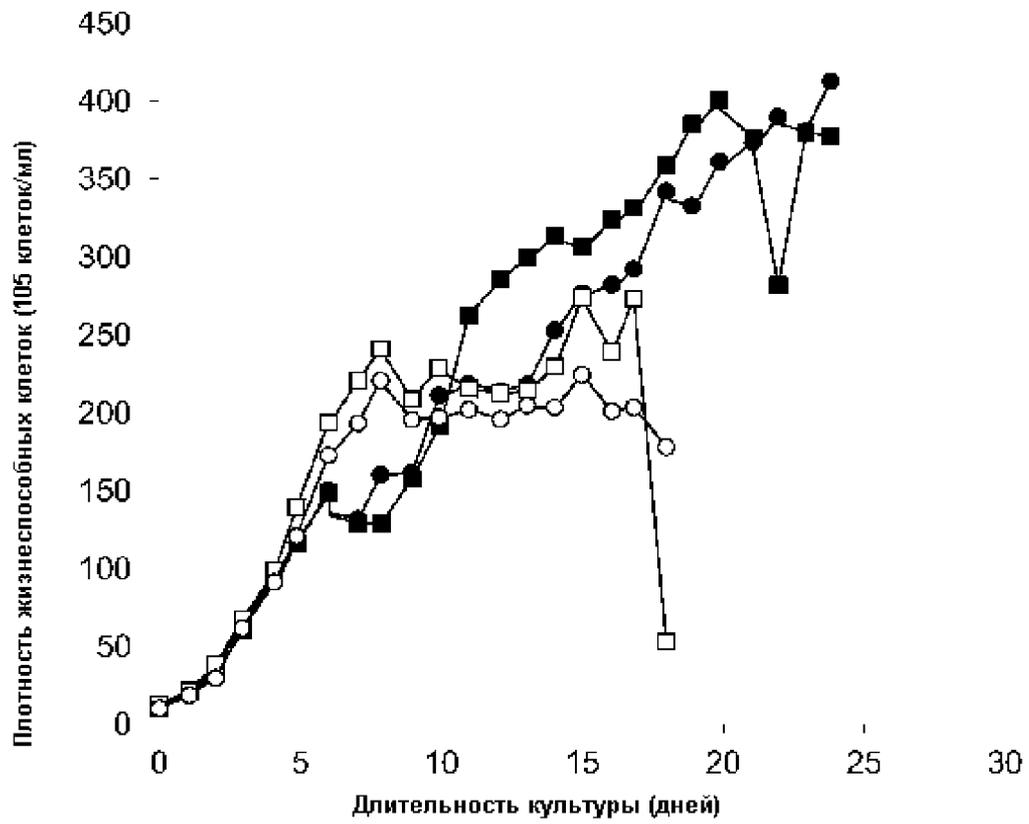
33. Способ по любому из пп. 1-32, который отличается тем, что емкость биореактора составляет, по меньшей мере, 500 л.

34. Способ по любому из пп. 1-32, который отличается тем, что емкость биореактора составляет, по меньшей мере, от 500 л до 2000 л.

35. Способ по любому из пп. 1-32, который отличается тем, что емкость биореактора составляет, по меньшей мере, от 1000 л до 2000 л.

36. Способ по любому из пп. 1-35, который отличается тем, что клетки млекопитающих являются клетками яичника китайского хомячка (ЯКХ).
37. Способ по любому из пп. 1-36, который отличается тем, что рекомбинантный белок выбирается из группы, содержащей человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело или цитокин.
38. Способ по любому из пп. 1-36, который отличается тем, что рекомбинантный белок представляет собой рекомбинантный белок слияния.
39. Способ по любому из пп. 1-38, который отличается тем, что содержит стадию сбора рекомбинантного белка, произведенного клеточной культурой.
40. Способ по любому из пп. 1-39, который отличается тем, что рекомбинантный процесс, произведенный клеточной культурой, очищается и формируется в фармакологически допустимом составе.
41. Способ по п. 2, который отличается тем, что производство рекомбинантного белка в клеточной культуре млекопитающих растет по сравнению с культурой, в которой клетки не были обработаны ограничивающим рост L-аспарагином.

1/23

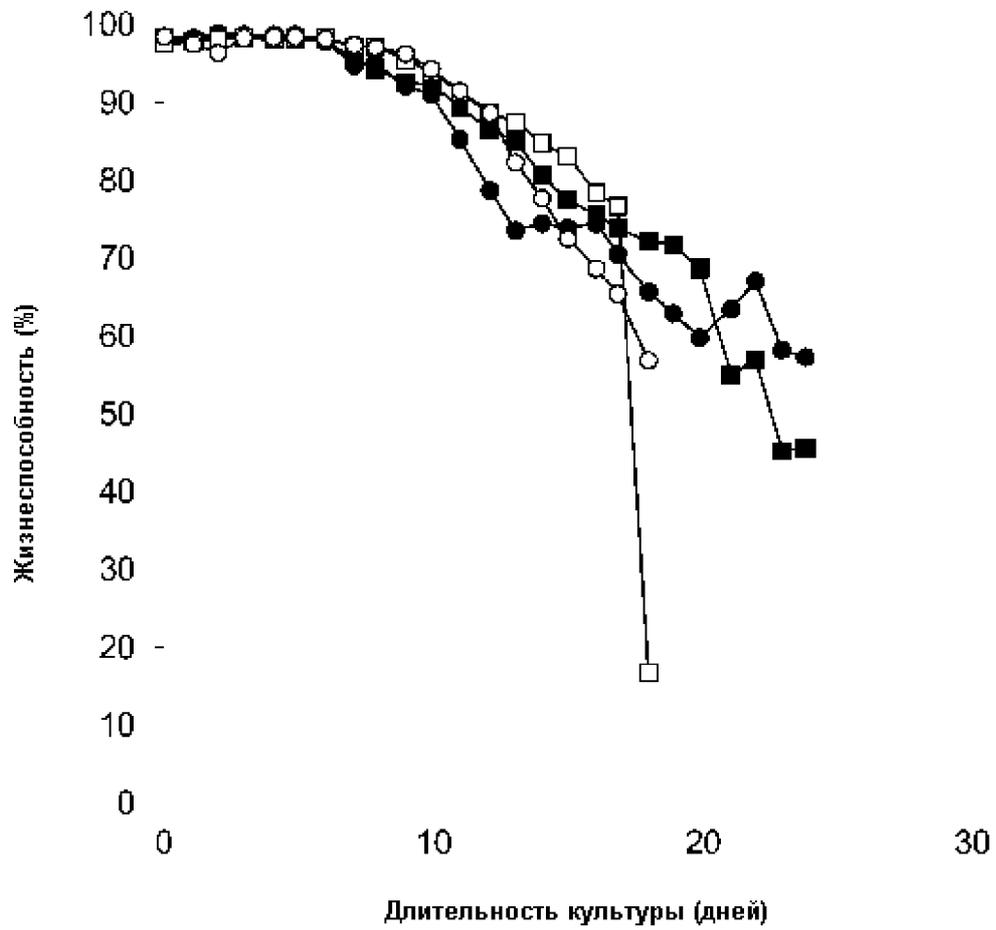


Фиг. 1 А

WO 2013/006479

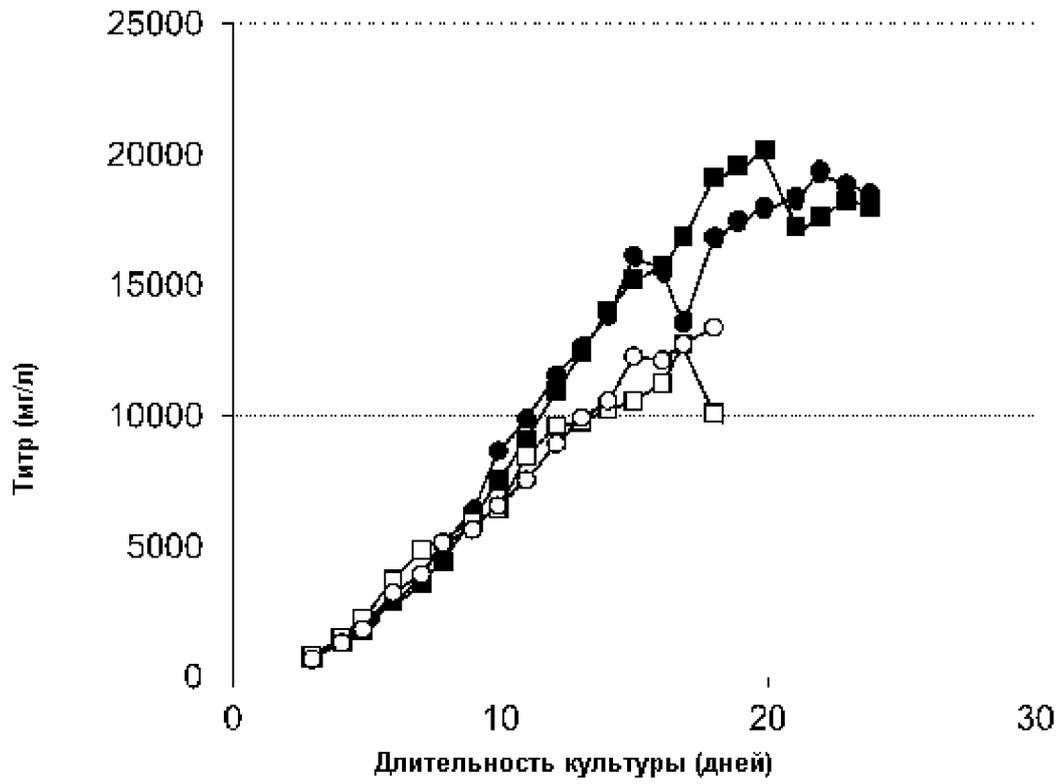
PCT/US2012/045070

2/23

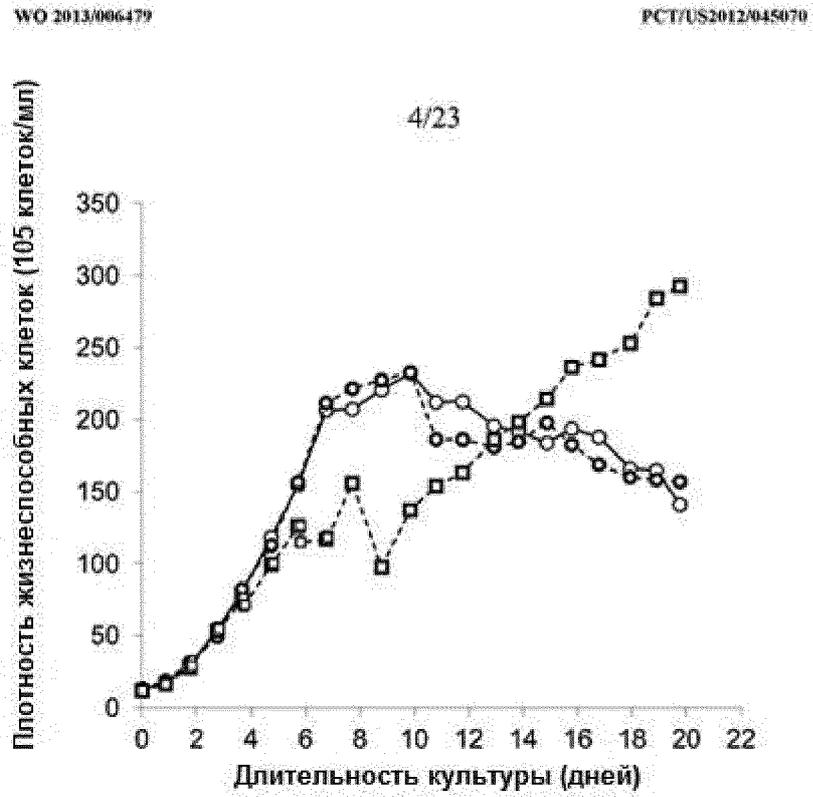


Фиг. 1 В

3/23



Фиг. 1 С

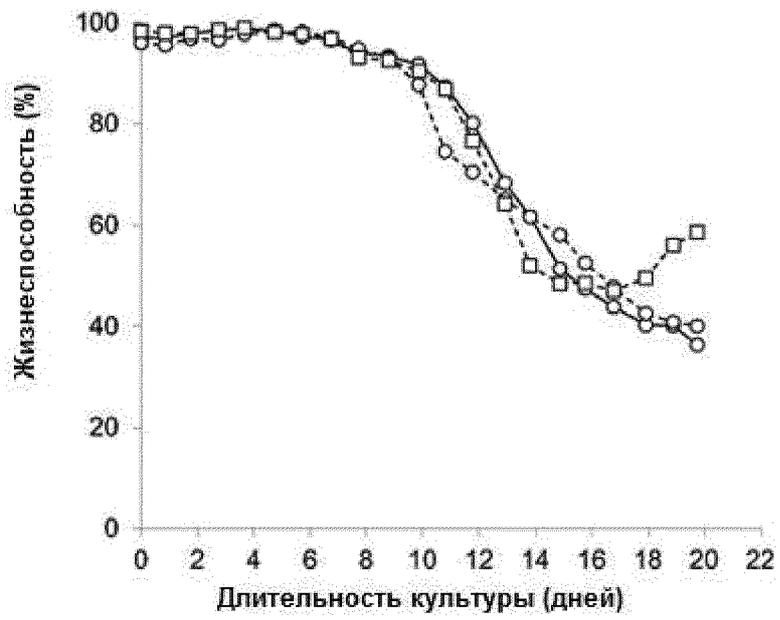


Фиг. 2 А

WO 2013/066479

PCT/US2012/045070

5/23

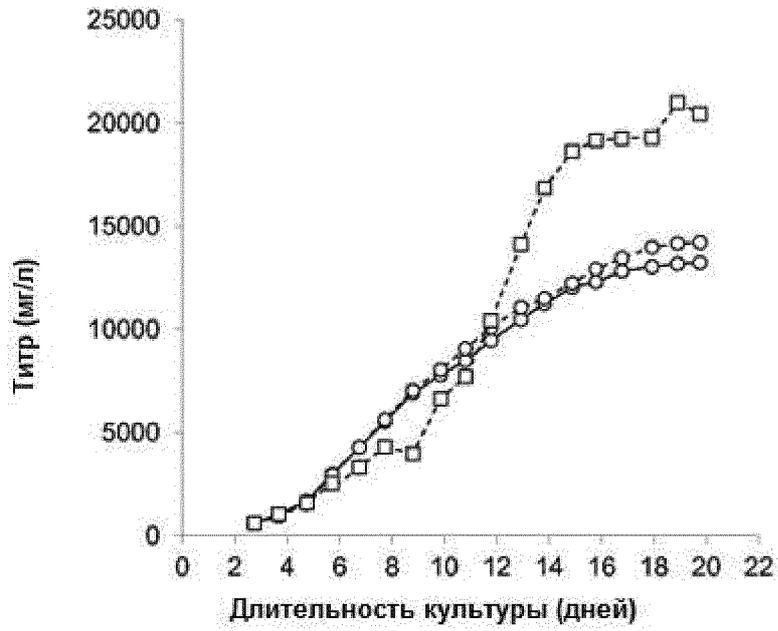


Фиг. 2 В

WO 2013/006479

PCT/US2012/045070

6/23

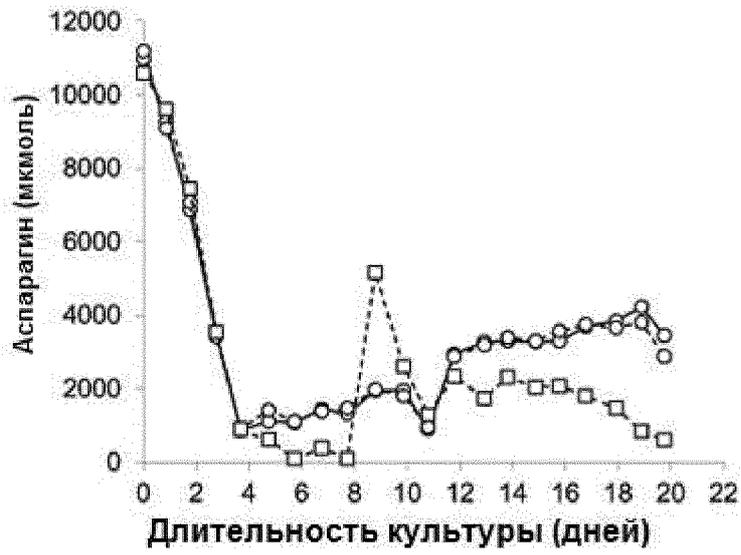


Фиг. 2 С

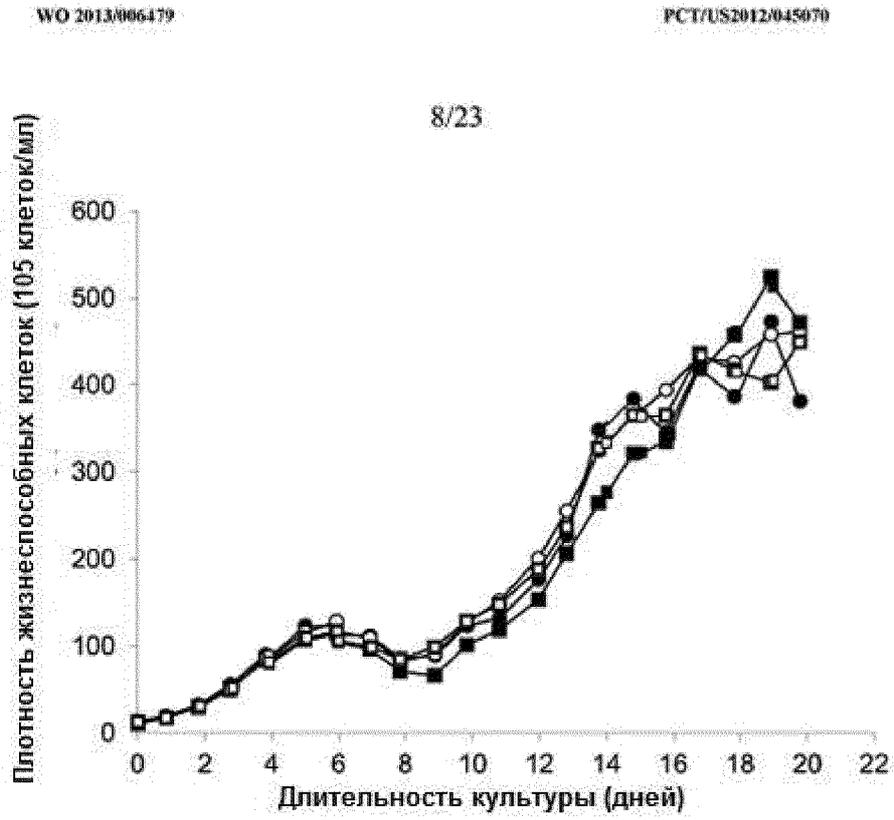
WO 2013/006479

PCT/US2012/045070

7/23



Фиг. 2 D

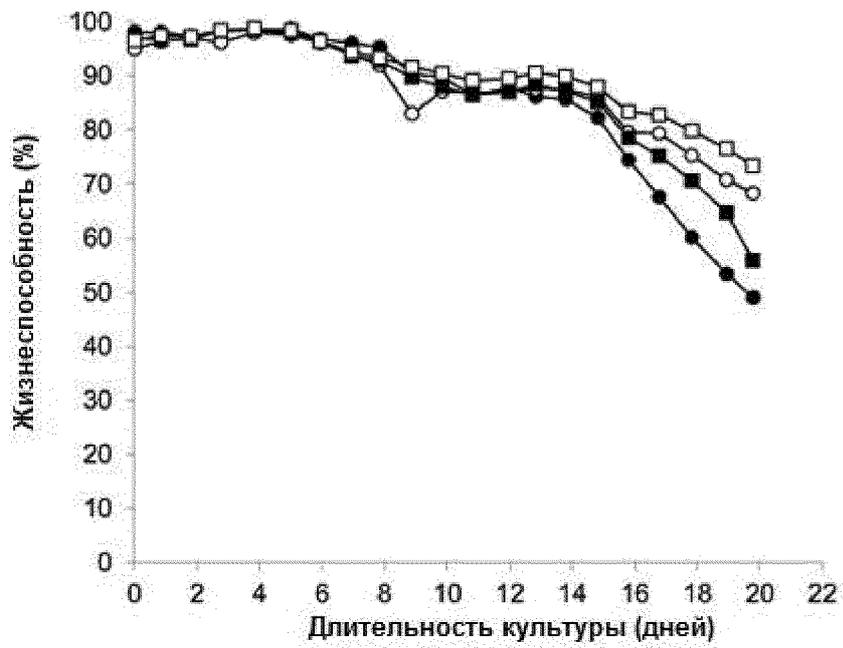


Фиг. 3А

WO 2013/066479

PCT/US2012/045070

9/23

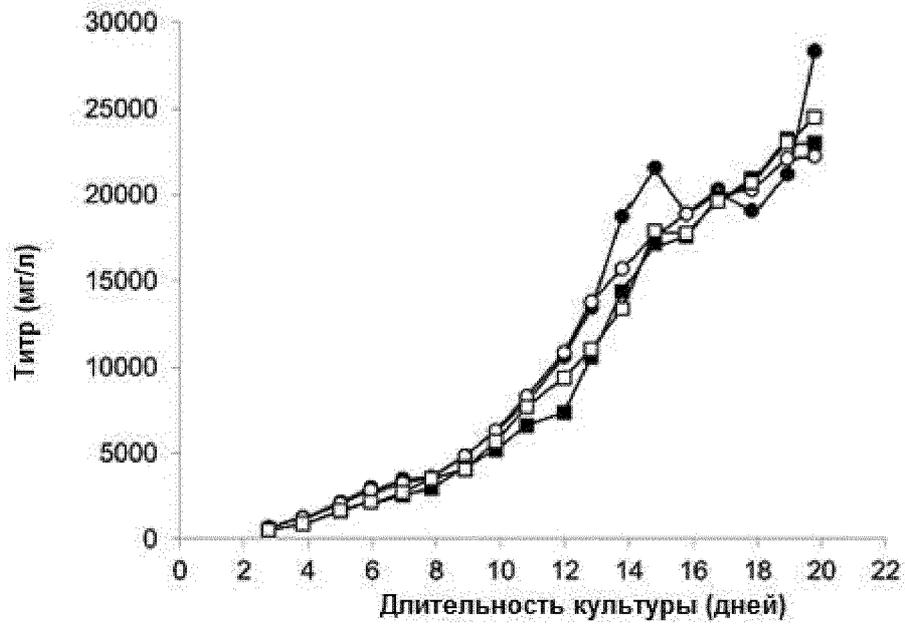


Фиг. 3В

WO 2013/066479

PCT/US2012/045070

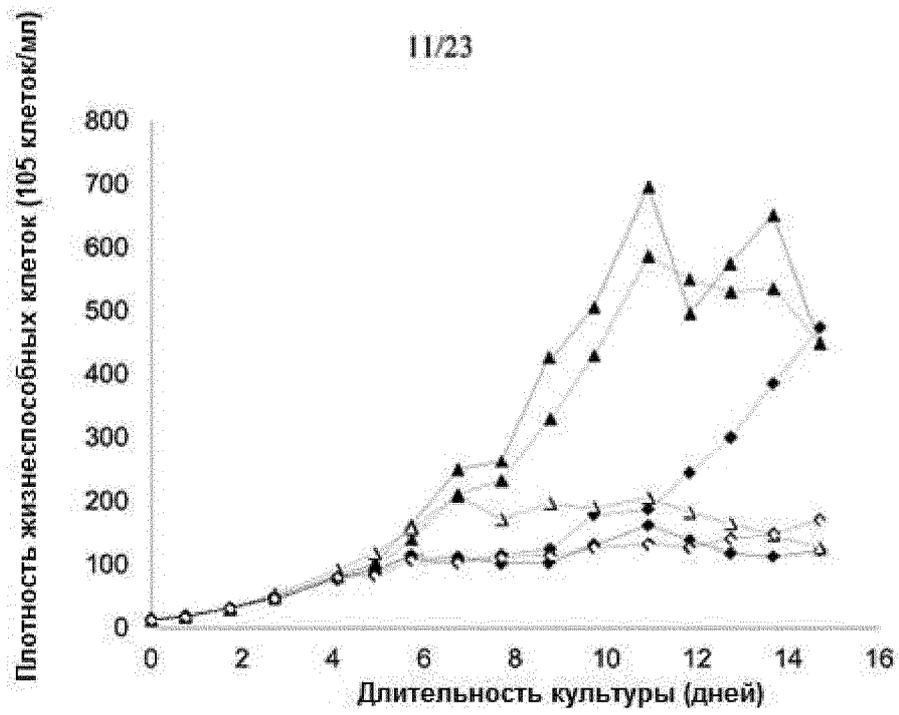
10/23



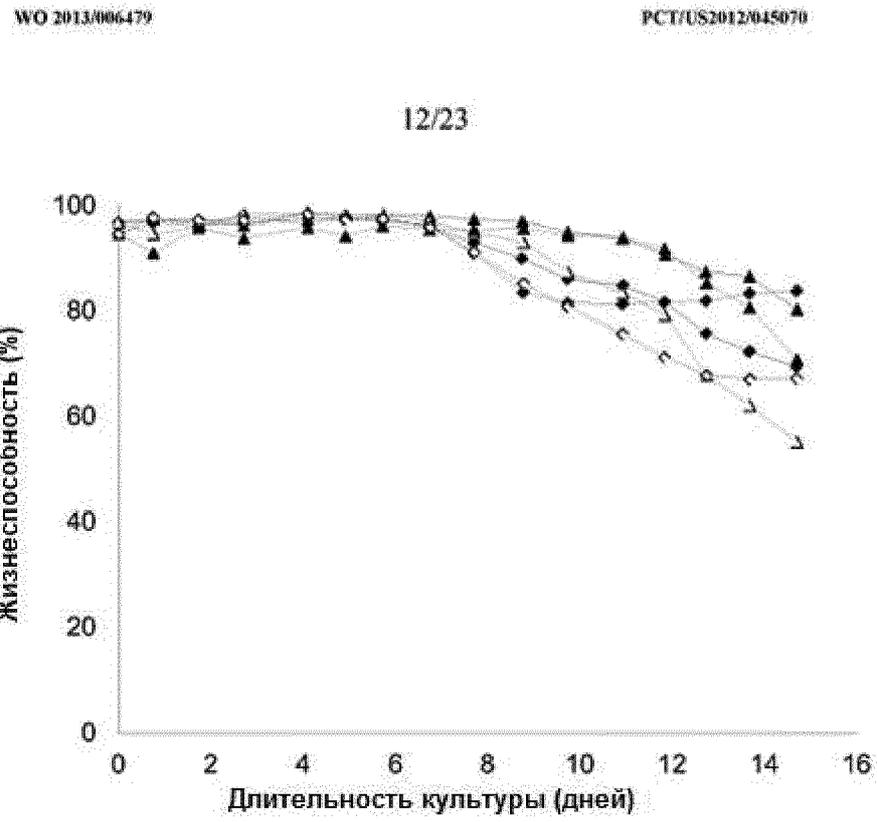
Фиг. 3С

WO 2013/006479

PCT/US2012/045070



Фиг. 4А

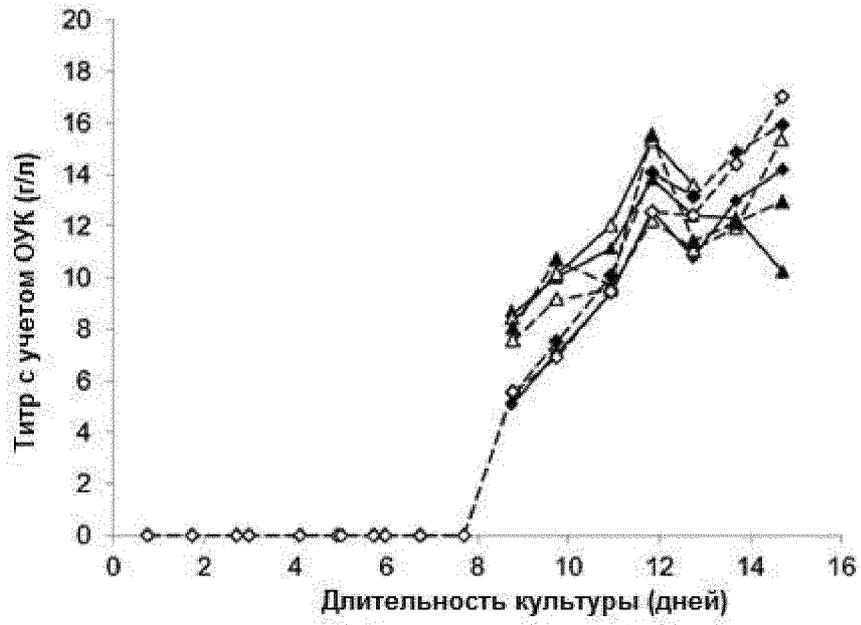


Фиг. 4В

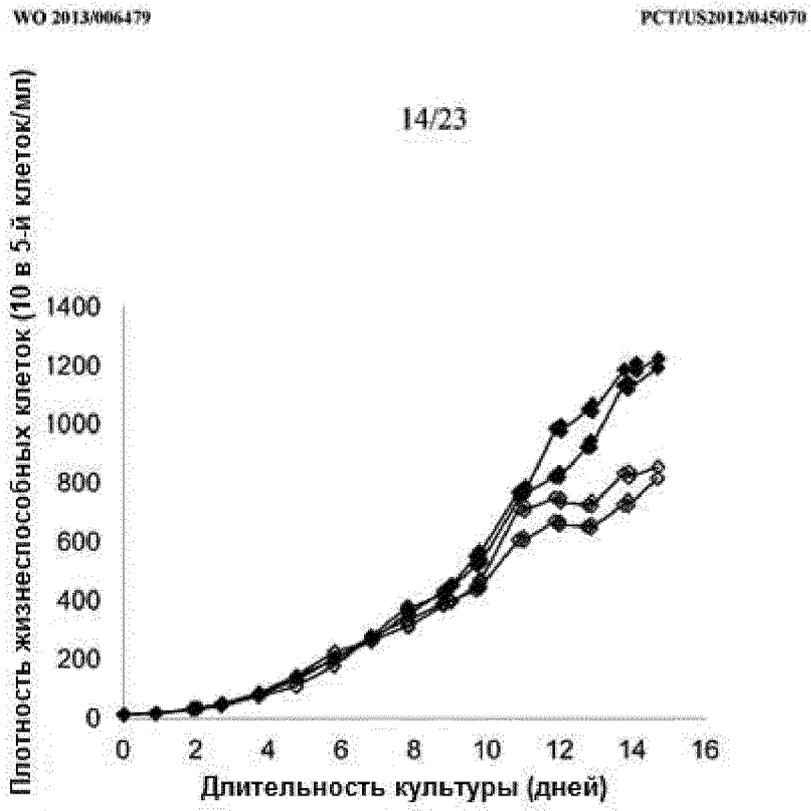
WO 2013/066479

PCT/US2012/045070

13/23



Фиг. 4С

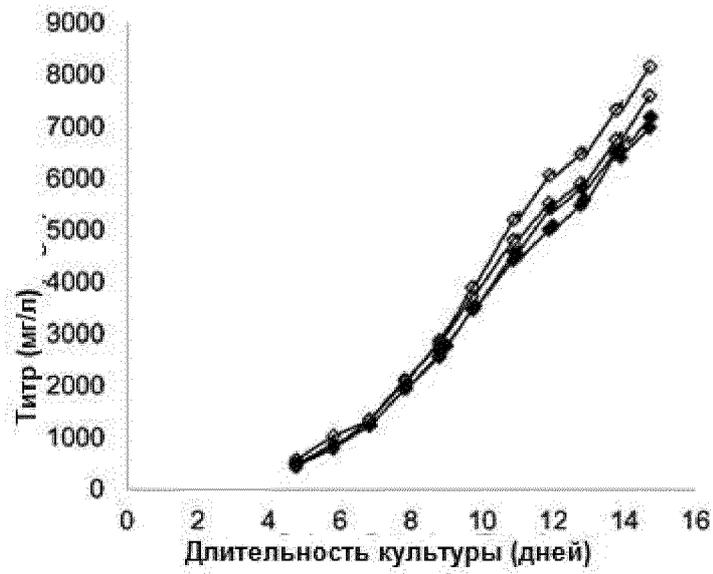


Фиг. 5А

WO 2013/006479

PCT/US2012/045070

15/23

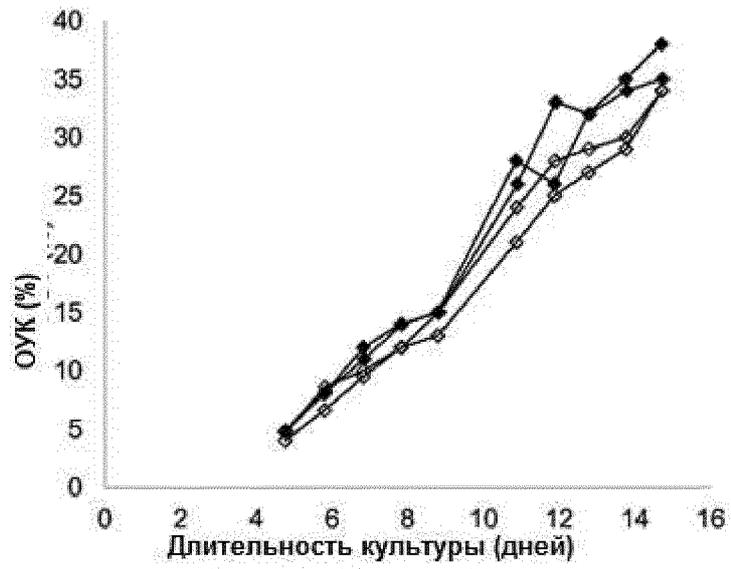


Фиг. 5В

WO 2013/096479

PCT/US2012/045070

16/23

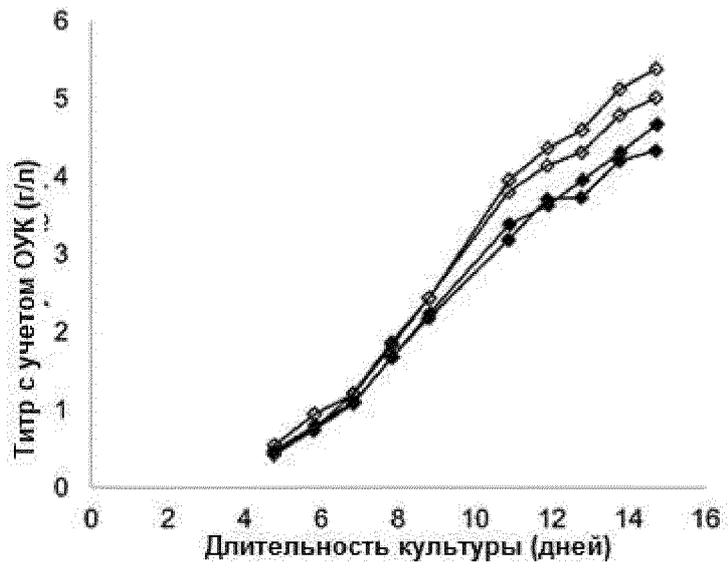


Фиг. 5С

WO 2013/006479

PCT/US2012/045070

17/23

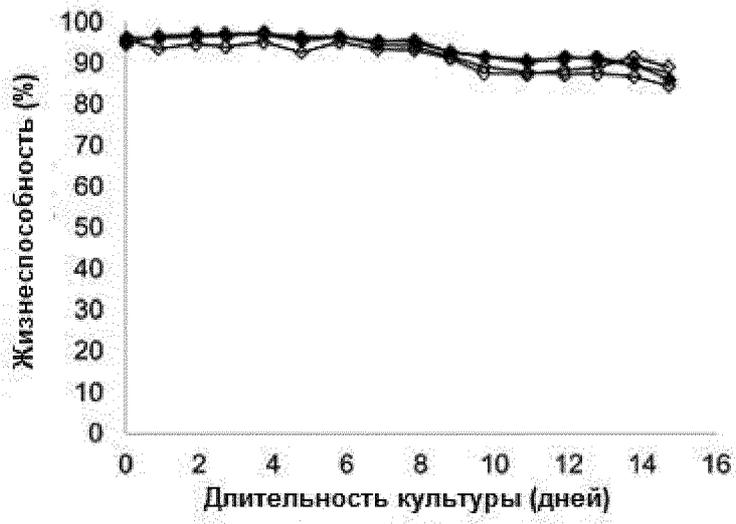


Фиг. 5D

WO 2013/086479

PCT/US2012/045070

18/23

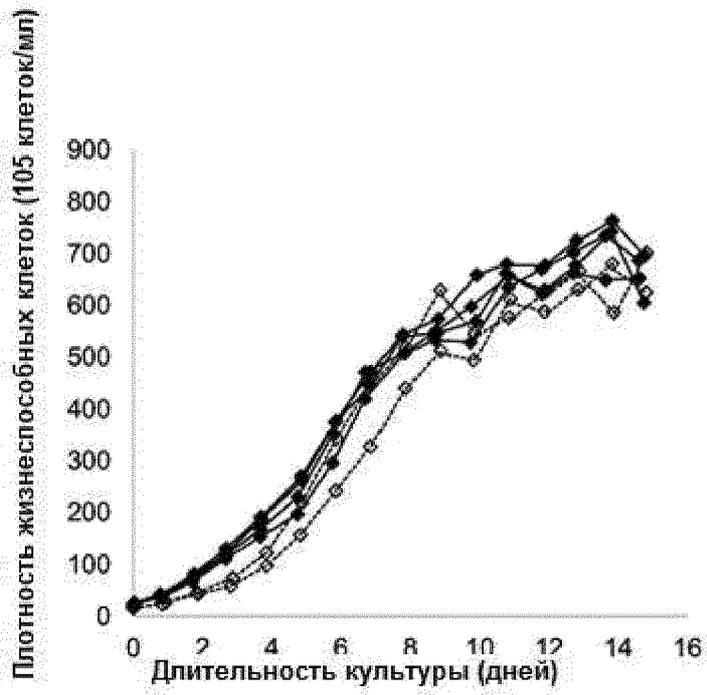


Фиг. 5E

WO 2013/066479

PCT/US2012/045070

19/23

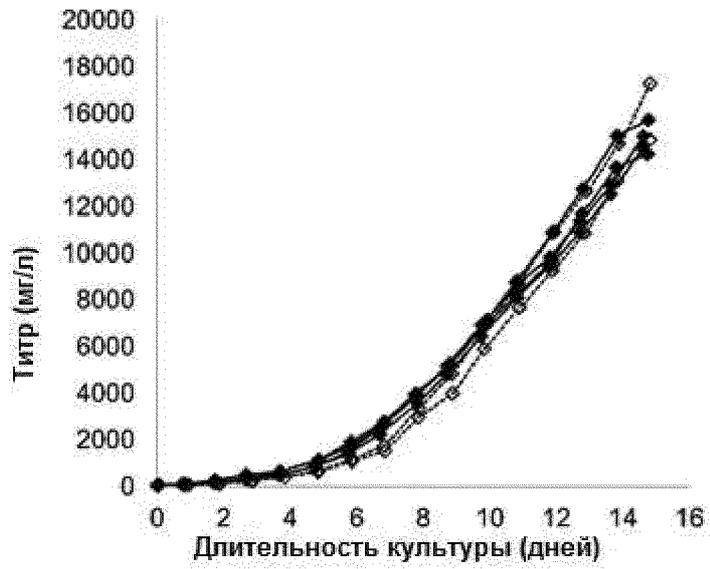


Фиг. 6А

WO 2013/006479

PCT/US2012/045070

20/23

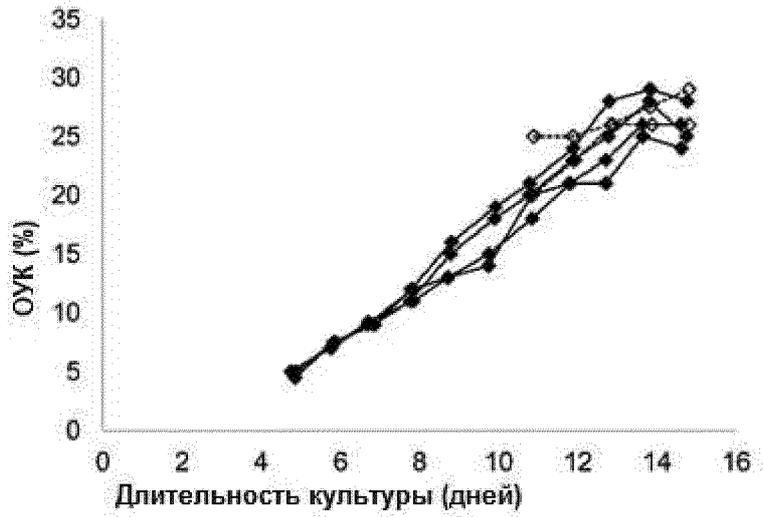


Фиг. 6В

WO 2013/006479

PCT/US2012/045070

21/23

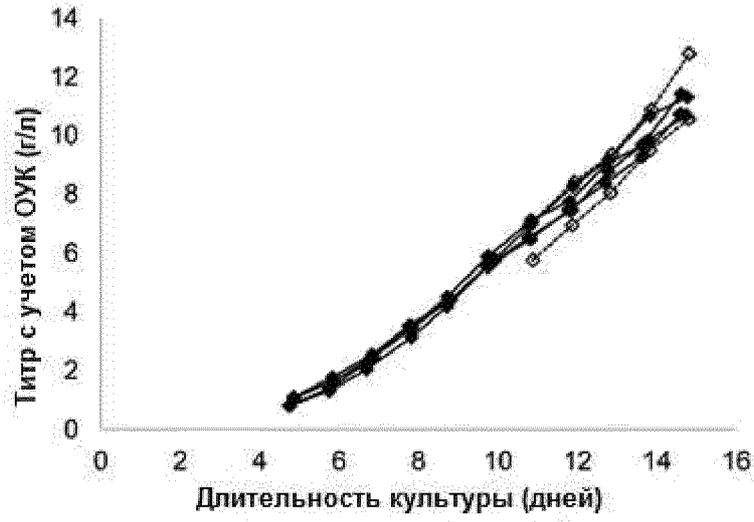


Фиг. 6С

WO 2013/086479

PCT/US2012/045070

22/23

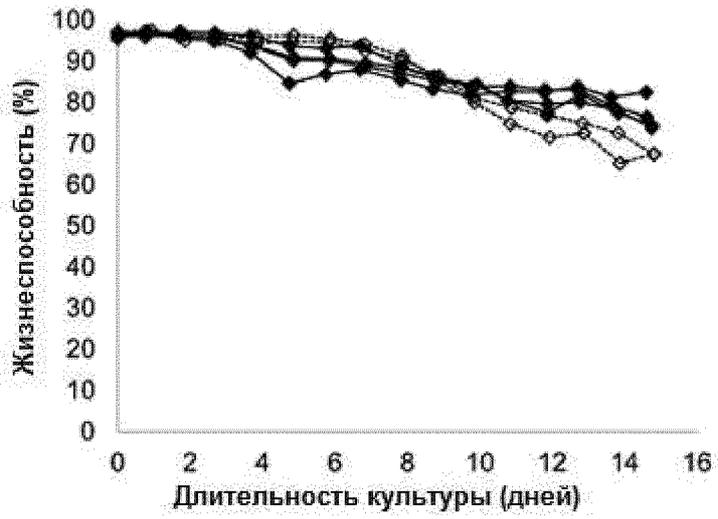


Фиг. 6D

WO 2013/066479

PCT/US2012/045070

23/23



Фиг. 6Е